

Aus dem Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. R. Müller

In Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg

Ras-induzierte Differenzierung nach Schädigung der DNA in Zellen der aku- ten myeloischen Leukämie

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie

(Dr. rer. physiol.)

dem Fachbereich Medizin der

Philipps



**Universität
Marburg**

vorgelegt von

Mona Meyer

aus Bad Wildungen

Marburg an der Lahn, 2009

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am: 17.08.2009

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Herr Prof. Dr. Matthias Rothmund

Referent: Herr Prof. Dr. Andreas Neubauer

Korreferent: Frau Prof. Dr. Uta Maria Bauer

1	EINLEITUNG	7
1.1	HÄMATOPOESE.....	7
1.1.1	<i>Akute myeloische Leukämie</i>	<i>9</i>
1.1.1.1	Zytogenetik der akuten myeloischen Leukämie.....	10
1.1.1.2	Behandlung der akuten myeloischen Leukämie	13
1.2	DIE RAS-PROTEINFAMILIE	14
1.2.1	<i>Ras und Zellzyklus</i>	<i>17</i>
1.2.1.1	Zellzykluskontrolle.....	18
1.2.2	<i>Ras und Seneszenz</i>	<i>23</i>
1.2.3	<i>Ras und Apoptose.....</i>	<i>25</i>
1.2.4	<i>Ras und Differenzierung hämatopoetischer Zellen</i>	<i>26</i>
1.3	CALGB-STUDIE 8525	29
1.4	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	31
2	MATERIAL	33
2.1	CHEMIKALIEN.....	33
2.2	PUFFER UND LÖSUNGEN	33
2.2.1	<i>Zellkulturlösungen</i>	<i>33</i>
2.2.2	<i>Proteinbiochemische Lösungen</i>	<i>34</i>
2.2.2.1	Lyse-Puffer.....	34
2.2.2.2	Inhibitoren (Sigma)	35
2.2.2.3	Puffer für Western-Blot.....	35
2.2.2.4	Lösungen und Puffer für die Immunfluoreszenz	35
2.2.2.5	Sonstige Lösungen.....	36
2.2.2.6	Stammlösungen.....	36
2.3	ZELLINIEN UND BAKTERIENSTÄMME	37
2.3.1	<i>Säuger-Zellen</i>	<i>37</i>
2.3.2	<i>Bakterienstämme.....</i>	<i>37</i>
2.4	MEDIEN.....	37
2.4.1	<i>Zellkulturmedien</i>	<i>37</i>
2.4.1.1	Antibiotika	37
2.4.1.2	Zusätze	38
2.4.2	<i>Bakterienmedien</i>	<i>38</i>
2.4.2.1	Antibiotika	38
2.5	EXPRESSIONSPASMIDE	38
2.6	OLIGONUKLEOTIDE	39
2.6.1	<i>qRT-PCR Primer.....</i>	<i>39</i>
2.6.2	<i>Sequenzierprimer.....</i>	<i>39</i>
2.6.3	<i>RT-PCR Primer zur Expressionsanalyse von MLL-ENL</i>	<i>40</i>
2.6.4	<i>Primer für cDNA-Synthese.....</i>	<i>40</i>

2.7	KITS	40
2.8	ENZYME UND STANDARDS.....	40
2.8.1	Enzyme.....	40
2.8.2	Molekulargewichtstandards.....	41
2.9	ANTIKÖRPER.....	41
2.9.1	Primäre Antikörper.....	41
2.9.2	Sekundäre Antikörper.....	42
2.9.3	Antikörper für FACS.....	42
2.10	EINMAL- UND PLASTIKWARE	43
2.11	GERÄTE.....	43
3	METHODEN	46
3.1	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	46
3.1.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen	46
3.1.1.1	Kultivierung der Phoenix ^{Eco} -Zellen.....	46
3.1.1.2	Das MLL-ENL Zellsystem	47
3.2	DURCHFLUSSZYTOMETRIE.....	54
3.2.1	FACS (<u>F</u> luorescence- <u>a</u> ctivated <u>c</u> ell <u>s</u> orting) Analyse von Oberflächenmarkern.....	54
3.2.1.1	Magnetische Separation von Zellen	55
3.2.2	Intrazelluläre phospho-Chk1 FACS Analyse	55
3.2.2.1	Zweidimensionale phospho-Chk1/Mac1 FACS Analyse	56
3.2.3	Zweidimensionale Propidiumjodid-BrdU FACS Analyse	56
3.2.4	Intrazelluläre aktive-Caspase 3 FACS Analyse.....	57
3.3	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	57
3.3.1	Transformation von kompetenten Bakterien mit Plasmid-DNA	57
3.3.2	Isolierung von Plasmid-DNA	57
3.3.3	Restriktionsverdau von Plasmid-DNA.....	58
3.3.3.1	Dephosphorylierung der geschnittenen Plasmid-DNA	59
3.3.4	Extraktion von Nukleinsäuren aus Agarosegelen.....	59
3.3.5	Ligation von DNA-Fragmenten	59
3.4	EXPRESSIONSANALYSEN.....	60
3.4.1	Isolierung von gesamt RNA.....	60
3.4.2	Reverse Transkription zur cDNA Synthese	61
3.4.3	RT-PCR zur Expressionsanalyse von MLL-ENL-ER.....	61
3.4.4	Quantitative Echtzeit-PCR: Real time PCR.....	62
3.5	BIOCHEMISCHE METHODEN.....	63
3.5.1	Gesamtzelllysate	63
3.5.2	Ras Aktivierungs-Assay.....	63
3.5.3	Proteinbestimmung nach Bradford.....	64
3.5.4	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	64

3.5.5	Western-Blot.....	65
4	ERGEBNISSE	67
4.1	GENERIERUNG RAS ^{V12} -INFIZIERTER MLL-ENL-ER ZELLEN	67
4.1.1	RAS-infizierte Zellen zeigen Aktivierung des Onkogens	68
4.1.2	RAS ^{V12} hat keinen Einfluss auf die Expression von MLL-ENL-ER und die Genexpression von MLL-ENL Zielgenen	69
4.2	EFFEKT VON CYTARABIN AUF KONTROLL-ZELLEN UND RAS-INFIZIERTE ZELLEN	70
4.2.1	Die Behandlung mit Cytarabin wirkt gleichermaßen auf die Vitalität von Kontroll-Zellen und RAS-infizierten Zellen	71
4.2.2	Cytarabin wirkt in beiden Zelllinien gleichermaßen auf die Zellen in der S-Phase	71
4.2.3	RAS-infizierte Zellen zeigen ein vermindertes klonogenes Potential nach Cytarabin-Behandlung	73
4.2.4	RAS-infizierte Zellen zeigen verminderte Klonogenität nach Daunorubicin- und Etoposid-Behandlung	75
4.2.4.1	Kontroll-Zellen und RAS-infizierte Zellen bestehen aus unterschiedlichen Populationen	77
4.3	EINFLUSS VON CYTARABIN AUF DIE APOPTOSERATE VON KONTROLL-ZELLEN UND RAS-INFIZIERTEN ZELLEN	78
4.3.1	Cytarabin induziert den Apoptose Marker noxa in Kontroll-Zellen und RAS-infizierten Zellen.	79
4.3.2	RAS-infizierte Zellen zeigen weniger Caspase-Spaltung nach Cytarabin-Behandlung	79
4.4	RAS-INFIZIERTE ZELLEN ZEIGEN EIGENSCHAFTEN VON SENESZENTEN ZELLEN	81
4.4.1	Cytarabin induziert die Expression der Seneszenzmarker p15 ^{Ink4b} und Dec1	82
4.4.2	RAS-infizierte Zellen zeigen keine erhöhte β-Galaktosidase Aktivität im Vergleich zu Kontroll-Zellen	83
4.4.3	RAS-infizierte Zellen zeigen hohe Expressionslevel von p53, p21 ^{Cip1} , p16 ^{Ink4a} und p19 ^{Arf}	84
4.5	RAS-INFIZIERTE ZELLEN ZEIGEN VERSTÄRKTE AKTIVIERUNG DER DNA-SCHADENSSIGNALKASKADE	85
4.5.1	Chk1 und H2A.x werden in RAS-infizierten Zellen nach Cytarabin-Behandlung stärker phosphoryliert	85
4.5.2	Chk1 wird in RAS-infizierten Zellen nach Daunorubicin- und Etoposid-Behandlung stärker phosphoryliert	90
4.5.2.1	Chk1 wird in differenzierten Zellen nur in Anwesenheit von RAS ^{V12} phosphoryliert	91
4.5.3	ATM wird in RAS-infizierten Zellen nach DNA Schaden stärker phosphoryliert	92
4.6	RAS ^{V12} INDUZIERT DIFFERENZIERUNG	93
4.6.1	Die Expression der Gene ly6g und itgam ist in RAS-infizierten Zellen verstärkt	94
4.6.2	RAS-infizierte Zellen exprimieren den Stammzell-Marker c-kit schwächer	95
4.6.3	RAS-infizierte Zellen zeigen eine differenzierte Morphologie nach Cytarabin-Behandlung	96

4.7	DIE DIFFERENZIERUNG IST ABHÄNGIG VON DER AKTIVIERUNG DER DNA-SCHADENSSIGNALKASKADE	97
4.7.1	<i>Koffein blockt die Cytarabin-induzierte Differenzierung</i>	98
5	DISKUSSION	100
5.1	DIE KLONOGENITÄT DER RAS-INFIZIERTEN ZELLEN IST NACH CYTARABIN-BEHANDLUNG BEEINTRÄCHTIGT	100
5.1.1	<i>RAS-infizierte Zellen zeigen weniger Apoptose nach Cytarabin-Behandlung</i>	101
5.2	RAS-INFIZIERTE ZELLEN ZEIGEN MERKMALE VON SENESZENZ	102
5.2.1	<i>Onkogenes RAS verstärkt die DNA-Schadenssignalkaskade</i>	103
5.3	<i>RAS^{V12} INDUZIERT MYELOISCHE DIFFERENZIERUNG, DIE DURCH CYTARABIN VERSTÄRKT WIRD</i>	105
5.3.1	<i>Die Aktivierung von ATM/R ist notwendig für die myeloische Differenzierung</i>	107
	AUSBLICK	112
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	115
6.1	DEUTSCHE ZUSAMMENFASSUNG	115
7	LITERATURVERZEICHNIS	119
8	ABKÜRZUNGEN	132
9	ANHANG.....	135
	LEBENS LAUF.....	135
	VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER.....	136
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	137
	ORIGINALARBEIT	137
	KONGRESSBEITRAG	137
	DANKSAGUNG	138

1 Einleitung

RAS (*Rat Sarcoma*) wurde als eines der ersten Onkogene 1982 von Robert Allen Weinberg beschrieben (Shih, 1982 #407). Es kodiert für ein Protein, das an vielen zellulären Prozessen wie Zellteilung, Apoptose und Differenzierung beteiligt ist. 20-30% aller menschlichen Tumore weisen Punktmutationen im *RAS*-Gen auf, die die GTPase Aktivität des Proteins aktivieren. Dies trifft auch auf die akute myeloische Leukämie zu (Bos, 1985 #395). Das mutierte Ras-Protein aktiviert Signalwege, die die Zellteilung aktivieren und Apoptose hemmen, wodurch die Leukämogenese gefördert wird. Die prognostische Relevanz von *RAS*-Mutationen in der AML ist bis heute umstritten. Diese Arbeit untersucht, ob mutiertes *RAS* in einem hämatopoetischen Zellsystem die Reaktion der Zellen auf Chemotherapie-Behandlung verändert.

1.1 Hämatopoese

Unter Hämatopoese versteht man die Bildung der Blutzellen aus hämatopoetischen Stammzellen. Diese reifen unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren (z.B. SCF, GM-CSF) und Zytokinen (z.B. IL-3, IL-6) zu Erythrozyten, Leukozyten, Lymphozyten und Thrombozyten heran. Die hämatopoetischen Stammzellen sind multipotente Zellen, d.h. sie haben die Fähigkeit, in unterschiedliche Zelltypen zu differenzieren, und können jeden Zelltyp des Blutsystems bilden. Die Entwicklung einer reifen Blutzelle aus einer Stammzelle erfolgt in mehreren Schritten (**Abb. 1**). Aus der Stammzelle entstehen myeloide und lymphoide Vorläuferzellen. Aus den lymphoiden Vorläuferzellen entwickeln sich unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren und Zytokinen B- und T-Lymphozyten, die die Aufgabe haben, als „fremd“ erkannte Peptide zu erkennen und zu eliminieren. Aus den myeloiden Vorläufern entwickeln sich Erythrozyten, Megakaryozyten, aus denen wiederum Thrombozyten entstehen, und myeloische Zellen (ausgehend von Myeloblasten). Die Entwicklung von Myeloblasten in Monozyten bzw. Granulozyten (Basophile, Neutrophile, Eosinophile) verzweigt sich in die Monozyten-Linie, aus der reife Monozyten und Makrophagen entstehen, und in die myeloide Linie. In dieser Linie reifen die Zellen von Promyelozyten zu Myelozyten und unreifen Basophilen heran. Die Letzteren entwickeln sich zu reifen Basophilen. Aus den Myelozyten entstehen Metamyelozyten, die weiter zu stabkernigen Granulozyten differenzieren, die sich zu reifen segmentkernigen neutrophilen (Polymorphonuklearen Zellen) und eosinophilen Granulozyten entwickeln.

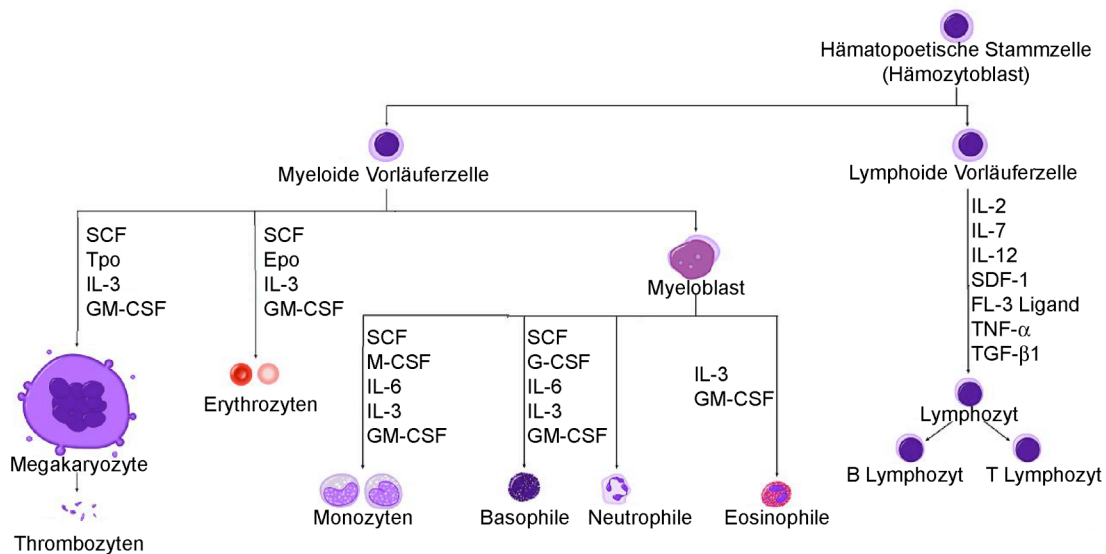


Abb. 1: Hämatopoese. Aus einer multipotenten hämatopoetischen Stammzelle entstehen myeloide und lymphoide Vorläuferzellen. Aus letzteren entwickeln sich, unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren und Zytokinen, die B- und T-Lymphozyten, die vorwiegend das erlernte Immunsystem repräsentieren. Aus den myeloiden Vorläufern entwickeln sich in verschiedenen Stufen die myeloiden Zellen, zu denen die Monozyten und Granulozyten (Basophile, Neutrophile und Eosinophile) gehören. Diese stellen die wichtigsten Zellen der angeborenen Immunität dar. Außerdem reifen aus den myeloiden Vorläuferzellen die Erythrozyten und Megakaryozyten heran. Aus den Megakaryozyten wiederum entwickeln sich Thrombozyten.

Die unterschiedlichen Entwicklungsstufen können durch Oberflächenmarker, sogenannte CD (*Cluster of Differentiation*)-Moleküle, nachgewiesen werden. Bei diesen Markern handelt es sich z.B. um membrangebundene Glykoproteine oder Rezeptoren, die zellspezifisch exprimiert werden und durch monoklonale Antikörper detektiert werden können. Einer dieser Oberflächenmarker ist z.B. Mac1, ein heterodimeres Integrin, das auf der Oberfläche von Monozyten, Granulozyten, Makrophagen und natürlichen Killerzellen exprimiert wird. Dieses Protein ist an der Adhäsion und Migration der Zellen beteiligt und spielt u.a. eine Rolle in der Phagozytose, Chemotaxis und im Komplementsystem. Auch Granulozyten exprimieren Mac1, wobei für eine spezielle Charakterisierung dieser Zellen der Marker Gr1 zur Verfügung steht. Hämatopoetische Stammzellen exprimieren den Stammzellmarker c-kit und sind negativ für die Differenzierungsmarker Mac1 und Gr1. c-kit ist eine Rezeptortyrosinkinase, die durch den Liganden SCF aktiviert werden kann. Die Bindung des Liganden an den Rezeptor

hat die Induktion des MAP Kinase Signalwegs zur Folge, wodurch die Zelle zur Proliferation angeregt wird (Wandzioch, 2004 #366, Tauchi, 1994 #365).

1.1.1 Akute myeloische Leukämie

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine Form der Krebserkrankung, bei der die Differenzierung der Myeloblasten zu reifen Granulozyten und Monozyten blockiert ist. Die Blasten zeichnen sich durch uneingeschränkte Proliferation aus und akkumulieren im Knochenmark, was die Bildung der gesunden Blutzellen behindert. Diese unreifen Vorläuferzellen zeigen noch keine Funktionen hinsichtlich der Immunabwehr, die Aufgabe, die sie als differenzierte Granulozyten und Monozyten normalerweise übernehmen. Mutationen, die zu einer Blockade der Differenzierung führen, nennt man Mutationen der Klasse II. Diese betreffen u.a. die Transkriptionsfaktoren wildtyp Nucleophosmin, wildtyp C/EBP α sowie die Fusionsproteine AML-ETO und PML-RAR α (Larsen, 1992 #93; Frohling, 2005 #94). Mutationen der Klasse II sind aber allein nicht ausreichend, eine Leukämie zu erzeugen. Kommt es in der Vorläuferzelle, die bereits eine Klasse II-Mutation trägt, zu einer weiteren genetischen Veränderung, die die Aktivierung von Rezeptor-Tyrosin Kinasen oder Ras zur Folge hat (Klasse I Mutationen), kann dies zur Transformation der Zelle führen (Gilliland, 2002 #396). Die Mutation der Klasse I ist also nach diesem Modell für verstärkte myeloide Zellteilung und die der Klasse II für den Differenzierungsblock verantwortlich.

Die akute myeloische Leukämie ist die häufigste akute Leukämie bei Erwachsenen und tritt häufiger mit zunehmendem Alter auf. Da die Blasten die gesunden Knochenmarkzellen, wie z.B. die roten und weißen Blutzellen und die Blutplättchen verdrängen, gehen die Symptome mit Müdigkeit, Kurzatmigkeit, verstärkter Blutungsneigung und einem erhöhten Infektionsrisiko einher. Die akute myeloische Leukämie führt innerhalb weniger Wochen bis Monate zum Tod, wenn die Krankheit unbehandelt bleibt. Die Behandlung der AML erfolgt mit konventionellen Chemotherapeutika wie Cytarabin und Daunorubicin.

Ein erster Hinweis auf eine AML kann eine Vermehrung von weißen Blutzellen (Blasten), die anhand eines Differentialblutbildes zu erkennen sind, sein. Die Diagnose wird durch eine Knochenmarkpunktion gesichert und liegt dann vor, wenn der Anteil unreifer Blasten im Knochenmark mehr als 20% beträgt. AML ist eine Krebserkrankung mit einer Inzidenz von etwa drei Neuerkrankungen/100.000 im Jahr.

Für das Auftreten einer AML sind einige Risikofaktoren identifiziert. Diese können z.B. pre-leukämische Funktionsstörungen der Zellen im Knochenmark sein, die zum myelodysplastischen oder myeloproliferativen Syndrom führen. Aus diesen Krankheiten kann sich nachfolgend eine AML entwickeln. Alkylierende Mittel, die als Chemotherapeutika eingesetzt werden, als auch ionisierende Strahlung können das Risiko, an einer AML zu erkranken, erhöhen. Auch bei Patienten mit Down Syndrom wurde ein 10- bis 18-fach höheres Risiko, eine AML zu entwickeln, festgestellt.

1.1.1.1 Zytogenetik der akuten myeloischen Leukämie

Die zytogenetische Untersuchung der Blasten ist für die Einschätzung der Prognose sehr wichtig. Es existieren zytogenetische Aberrationen, welche mit einer guten, einer mittleren und einer schlechten Prognose assoziiert sind (Fenaux, 1989 #95; Grimwade, 1998 #98). Die Hälfte aller AML-Patienten weist einen normalen Karyotyp auf. Dieser ist mit einer mittleren Risikogruppe assoziiert, d.h. das Risiko, nach Ende der Behandlung einen Rückfall zu erleiden, liegt bei ca. 50%. Im Gegensatz zu vielen anderen Tumoren ist der Tumorsuppressor p53 in weniger als 10% der AML mutiert (Renneville, 2008 #394).

Durch chromosomale Translokationen kommt es zur Entstehung von Fusionsproteinen, die häufig als Transkriptionsfaktoren mit veränderten Eigenschaften die Expression von Differenzierungsgenen blockieren. Zu den häufigsten Fusionsonkoproteinen zählen PML-RAR α , das aus der Translokation t(15;17) entsteht, und AML-Eto, das Produkt aus der Translokation t(8;21). Die Inversion des Chromosoms 16 (inv(16)) zerstört den Transkriptionsfaktor CBF- β . Dieser bindet in normalen Zellen an den Transkriptionsfaktor AML1, wodurch es zur Bindung von AML1 an die DNA und damit zur Expression von Differenzierungsgenen kommt. Die zytogenetischen Veränderungen, welche mit einem mutierten CBF- β Signalweg einhergehen (Translokation t (8;21) und Inversion inv (16)), werden der prognostisch günstigen Risikogruppe zugeordnet (Rückfallrisiko: 33%). Daneben gibt es zytogenetische Abberationen, die mit einer schlechten bis sehr schlechten Prognose und einem hohen Rückfallrisiko (78%) assoziiert sind. Darunter fallen der Verlust des Chromosoms 5 und 7, der Verlust des Chromosom-Arms 5q, Veränderungen im Chromosombereich 3q und komplexe Karyotypen.

Eine Reihe von Studien, darunter auch die der *Cancer and Leukemia Group B* (CALGB), haben retrospektiv den Einfluss der Zytogenetik auf die Überlebens- und

Rezidivrate der Patienten nach der Chemotherapie-Behandlung untersucht (siehe Abschnitt 1.3).

1.1.1.1.1 Das MLL-ENL Fusionsprotein

Das Gen *MLL* (*Mixed Lineage Leukemia*) in humanen Zellen ist homolog zu dem *trithorax* Gen in *Drosophila melanogaster*. Translokationen im *MLL*-Gen kommen in ca. 10% der akuten myeloischen Leukämien bei Erwachsenen (Fu, 2007 #73; Huret, 2001 #99), in ca. 70-80% der akuten lymphatischen Leukämien bei Kindern (Rubnitz, 1999 #72; Behm, 1996 #399; Sorensen, 1994 #401), und in Leukämien, die nach vorhergehender Behandlung einer Krankheit mit Topoisomerase II Inhibitoren entstanden sind, vor. Aus den Translokationen entstehen chimäre Gene, deren Expression MLL-Fusionsonkoproteine bilden. Akute lymphoblastische Leukämie (ALL), die eine MLL-Genaberrationen tragen, zeigen eine schlechte Prognose (Chen, 1993 #402), wogegen die Prognosen akuter myeloischer Leukämien, die solche MLL-Fusionsproteine tragen, sich nicht von denen anderer AML Formen unterscheiden (Krivtsov, 2007 #321). Für MLL sind bisher mehr als 50 Fusionsproteine identifiziert worden. Zu den fünf häufigsten MLL Fusionen gehören MLL-AF4 oder t(4;11), MLL-AF6 oder t(6;11), MLL-AF9 oder t(9;11), MLL-AF10 oder t(10;11) und MLL-ENL, das aus der Translokation der Chromosomen 11 und 19 (t(11;19) (q23;p13.3)) entsteht. Alle MLL-Fusionsproteine führen zu Leukämien, die phänotypisch als AML, ALL (akute lymphoblastische Leukämie) oder biphenotypische Leukämie definiert werden können.

Das MLL-Protein hat eine Histon H3 Lysin 4 (H3K4) Methyltransferase-Aktivität, die u.a. zur Aktivierung der Expression von *HOX* Genen führt. *HOX* Gene kodieren Transkriptionsfaktoren, die an der Entwicklung von verschiedenen Geweben und des hämatopoetischen Systems beteiligt sind. Durch interchromosomale Translokationen wird der N-terminale Abschnitt von MLL an den C-Terminus eines anderen Proteins fusioniert, wodurch ein Fusionsonkoprotein entsteht. MLL verliert dabei seine Methyltransferase Domäne, die im C-terminalen Abschnitt lokalisiert ist. Mehrere MLL-Fusionsproteine, z.B. AF4, AF10 und ENL interagieren direkt mit einer H3K79 Methyltransferase, genannt DOT1L (Mueller, 2007 #60). Die Methylierung an Histon H3 Lysin 79 ist, wie auch H3K4, eine transkriptions-aktivierende Markierung an den Histonen (Guenther, 2007 #106; Lachner, 2003 #107). Dass MLL-Fusionsproteine die Genexpression durch diese Histon-Methylierung regulieren, geht aus der Beobachtung hervor, dass nach der Induktion von MLL-ENL die H3K79 Methylierungen an den Pro-

motoren von *hoxa9* und *meis1* ansteigt, was mit einer erhöhten Expression dieser Gene einhergeht (Milne, 2005 #63). Die Methylierung von H3K79, durch DOT1L, anstelle von H3K4, durch MLL, könnte zum Transformationspotenzial der MLL-Fusionsproteine beitragen. *In vivo* sind bislang jedoch keine veränderten H3K79 Methylierungen an *hoxa9* oder anderen MLL-Fusions-Zielgenen in Leukämien mit MLL-Fusionsproteinen nachgewiesen.

ENL ist ein nukleäres Protein mit einer Größe von 62 kDa. Embryos mit einer Deletion beider *ENL* Allele sterben noch vor der Implantation im Uterus, was auf eine essentielle Funktion dieses Proteins hinweist. Das ENL Protein enthält eine Transaktivierungsdomäne im C-terminalen Bereich. Die Aminosäure Sequenz dieser Transaktivierungsdomäne ist zwischen den MLL Fusionspartnern ENL, AF4 und AF-9 hoch konserviert (Rubnitz, 1994 #319) und für die onkogenen Eigenschaften der Fusionsproteine wichtig (Slany, 1998 #103; Prasad, 1995 #104). Der N-terminale Bereich des Proteins interagiert mit Histon H3 (Zeisig, 2005 #64). Die Aufreinigung von ENL-assoziierten Proteinen zeigt eine Zusammenlagerung von Proteinen, die als MLL-Fusionspartner bereits bekannt sind und Proteinen, wie pTEFb, ein Elongationsfaktor der Polymerase II, DOT1L und Polycomb-Proteinen, die an der Genrepression beteiligt sind. Diese Beobachtungen legen nahe, dass ENL die Transkription durch Regulation der Elongation und durch Modifikation des Chromatins steuert (Mueller, 2007 #60).

MLL-ENL *knock-in* Mäuse entwickeln innerhalb weniger Monate Leukämien (Forster, 2003 #101). Dabei transformieren die Fusionsonkoproteine nur hämatopoetische Zellen (Krivtsov, 2007 #321). Werden humane hämatopoetische *lineage*-negative Zellen mit retroviralem *MLL-ENL* infiziert, welche anschließend in immundefiziente Mäuse gespritzt werden, entwickeln diese Mäuse myeloide oder lymphoide Leukämien die der humanen Leukämie ähnlich sind. Nachfolgende Transplantationsexperimente lassen auch in den Empfänger-Mäusen Leukämien entstehen, da sich Leukämie-initiiierende Zellen (LICs) gebildet haben, durch die die Leukämien aufrecht erhalten werden (Barabe, 2007 #102). Die Leukämien stammen nicht nur von hämatopoetischen Stammzellen sondern auch von Progenitorzellen ab, obwohl Progenitorzellen normalerweise nicht mehr die Fähigkeit zur Selbsterneuerung enthalten (Na Nakorn, 2002 #109). Diese wird jedoch durch das Fusionsprotein MLL-ENL gleichsam reaktiviert. Im Vergleich zu *MLL*-transformierten hämatopoetischen Stammzellen ist das Transformationspotenzial dieser Progenitorzellen niedriger, da 10-mal mehr Zellen benötigt werden, um eine Leukämie zu induzieren (Cozzio, 2003 #108). Der Vergleich der Expressionsprofile von transformierten Stamm- und Progenitorzellen zeigt, dass MLL-Fusionsproteine nicht

die de-Differenzierung der Progenitoren induzieren, sondern, neben den Differenzierungsgenen auch die Expression von Stammzell-spezifischen Genen aktivieren (Krivtsov, 2006 #110).

1.1.1.1.2 Onkogenes Ras in Maus-Modellen der AML

Mutiertes *RAS* kommt häufig in humanen Tumoren vor. Adenokarzinome des Pankreas sind zu 90% und Kolonkarzinome und Schilddrüsentumore zu 50% betroffen. Der Anteil bei Lungentumoren und myeloischen Leukämien liegt bei 30% (Bos, 1989 #114).

In Maus-Modellen induziert mutiertes *ras* einen myeloproliferativen Zustand, aber keine Leukämie (Braun, 2004 #115; Chan, 2004 #116; Chan, 2006 #117; Parikh, 2006 #118). Erst in Kombination mit einem weiteren Onkogen wie z.B. PML-RAR α führt aktives Ras zu akuten Leukämien (Chan, 2006 #117). Onkogenes Ras hat nicht nur proliferationsinduzierende Eigenschaften, es kann in hämatopoetischen Zellen auch Differenzierung auslösen (Darley, 1999 #120; Hibi, 1993 #32; Shen, 2007 #121; Shen, 2004 #122; Hawley, 1995 #119).

1.1.1.2 Behandlung der akuten myeloischen Leukämie

Die Behandlung der AML gliedert sich in verschiedene Phasen: Einer frühen Induktionsphase (die ggf. wiederholt wird) schließen sich mehrere Konsolidierungszyklen an. Das Ziel der Induktions-Therapie ist es, dass leukämische Zellen soweit dezimiert werden, dass sie mit morphologischen Kriterien nicht mehr nachzuweisen sind (Erreichen einer so genannten kompletten Remission). Die nachfolgende Konsolidierung-Therapie wird eingesetzt, um restliche Blasten zu eliminieren und eine Heilungschance zu erzielen, um also die Remission zu erhalten, zu konsolidieren. In Induktions- und Konsolidierungstherapie werden vor allem der Antimetabolit Cytarabin sowie das Anthrazyklin Daunorubicin eingesetzt. Cytarabin wird während der Replikation in die DNA eingebaut, wodurch es zum Abbruch dieser kommt. Die cytotoxische Wirkung von Daunorubicin entsteht durch dessen Interkalation in die DNA, so dass die Struktur der DNA verzerrt wird, wodurch sowohl die Transkription als auch die Replikation gestört werden und durch die Bildung von Sauerstoffradikalen, die zu Schäden an der DNA führen.

In einer wichtigen Studie der *CALGB* wurde nachgewiesen, dass Patienten, welche in der Konsolidierungsphase höher dosiertes Cytarabin bekommen hatten, seltener rezi-

divierten als Patienten, welche Cytarabin in niedriger Dosierung bekommen hatten. (Mayer, 1994 #397).

Die akute myeloische Leukämie zeichnet sich durch eine starke Heterogenität aus, da die Transformation der hämatopoetischen Zellen an unterschiedlichen Entwicklungsstufen entlang der Differenzierungslinie auftreten kann. Dies erschwert die Behandlung der einzelnen Krankheitsfälle, denn die Wirkung der Chemotherapeutika auf die leukämischen Zellen ist von der Entwicklungsstufe abhängig, an der die Differenzierung blockiert ist. So ist beispielsweise eine Leukämie, deren Tumor-induzierende Zelle in der Differenzierungslinie sehr nah an der Stammzelle liegt, schwieriger zu behandeln, als eine Leukämie deren Tumorzellen schon weiter differenziert sind. Dies liegt u.a. daran, dass die Expression anti-apoptotischer Gene, wie z.B. *MCL1*, und Gene, die als aktive Transporter unter ATP-Verbrauch zelltoxische Stoffe aus der Zelle pumpen, z.B. *ABCB1*, in Stammzellen sehr viel höher ist als in differenzierten Zellen (Opferman, 2005 #111; Terskikh, 2003 #112; Scharenberg, 2002 #113). Alles in allem kann man sagen, dass die kombinierten Behandlungen (Induktion- und Konsolidierungstherapie) altersübergreifend nur bei bei 20-30% der Patienten zu einer Heilung führen. Es ist heute Standard, dass Patienten mit einem hohen Risiko für ein Rezidiv der Erkrankung (z.B. zytogenetische Hoch-Risikogruppen) oder einem Rezidiv der AML mit einer allogenen Stammzelltransplantation behandelt werden. Die allogene Stammzelltransplantation (Verpflanzung allogener Stammzellen und Immunzellen) ist zwar wegen erhöhter Infektionsrate und der Abstoßungsproblematik mit einer gewissen Therapie-assoziierten Mortalität assoziiert, wird aber genau hier angewendet, da mit dieser Maßnahme das Rezidivrisiko am geringsten ist (Estey, 2006 #398).

1.2 Die Ras-Proteinfamilie

Zur Ras-Proteinfamilie gehören die funktionell und strukturell ähnlichen Proteine H-Ras, K-Ras und N-Ras. Diese sind kleine G-Proteine, die im GTP-gebundenen Zustand aktiv sind und dann andere Proteine, meist Kinasen, aktivieren. Der aktive Zustand wird durch Guanin-Nukleotid-Austausch Faktoren (GEFs) herbeigeführt, die gebundenes GDP durch GTP ersetzen. GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) überführen Ras-Proteine dagegen in einen inaktiven Zustand, indem sie die Hydrolyse von GTP zu GDP beschleunigen (Bos, 2007 #301).

Es gibt drei *RAS*-Gene. Sie kodieren für die 21 kD Proteine H-Ras, N-Ras, K-Ras4A und K-Ras4B, wobei die beiden letztgenannten alternative Spleiß-Varianten des gleichen Gens sind. 85% der Aminosäuresequenz der drei Proteine sind homolog. Der N-terminale Bereich (Aminosäuren 1-165) enthält die hoch konservierte G-Domäne, bestehend aus *P-Loop*-Motiv (*Phosphat-binding Loop*) und *Switch I* und *Switch II* Motiv, die die Strukturen für die GTP-Bindung und nachfolgende Hydrolyse enthält. Der C-terminale Abschnitt, der auch als hypervariable Region bezeichnet wird, ist sehr heterogen. Die Aminosäuren dieser Region werden spezifisch posttranslational modifiziert, wodurch die Lokalisation der Ras-Proteine in der Membran festgelegt werden kann (Schubbert, 2007 #178). *RAS*-Gene, die eine Punktmutation in Codon 12, 13 oder 61 aufweisen, führen zu konstitutiv aktiven Ras-Proteinen, da die intrinsische GTPase Aktivität von Ras beeinträchtigt ist und verhindert wird, dass GAPs die Hydrolyse von GTP verstärken können. Hierdurch kommt es zur Akkumulation von GTP-gebundenem Ras (Schubbert, 2007 #178).

In seinem aktiven Zustand führt Ras zur Aktivierung mehrerer Signalkaskaden. Zu den Haupt-Effektor-Molekülen gehören die Serin/Threonin Kinase RAF, die Phospho-Inositol 3 Kinase (PI3K), RALGDS (*Ras related protein guanine nucleotide dissociation stimulator*) und die Phospholipase C ϵ (PLC ϵ) (**Abb. 2**).

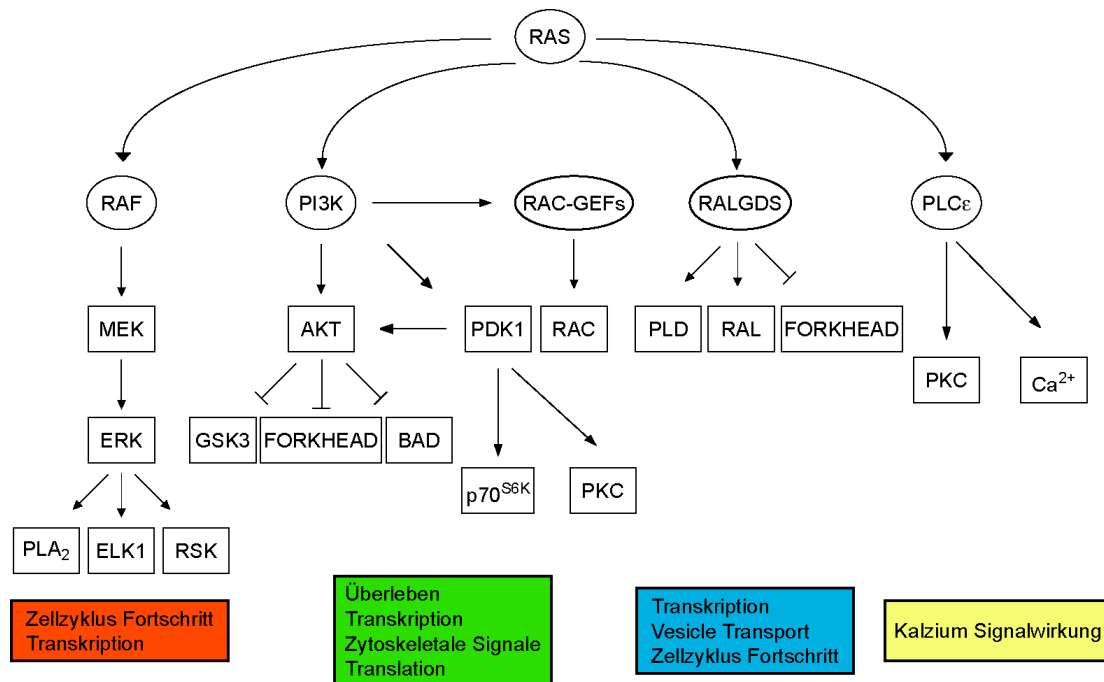


Abb. 2: Signalkaskaden, die durch Ras aktiviert werden. Vier Effektor-signalwege werden durch Ras aktiviert. Durch die Aktivierung von RAF/MEK/ERK werden Transkriptionsfaktoren aktiviert, die zur Ets Familie gehören. Diese wirken stimulierend auf den Zellzyklus. Die Aktivierung der PI3K hat die Phosphorylierung der Kinase AKT zur Folge. Dadurch werden Signale angeschaltet, die für das Überleben der Zelle wichtig sind. RALGDS-Proteine sind Guanin-Nukleotid Austausch Faktoren (GEFs) für RAL (Ras related protein). Phospholipase C ϵ führt zur Aktivierung von Protein Kinase C (PKC) und mobilisiert die Freisetzung von Ca²⁺. ERK (Extracellular Regulated Kinase); GSK3 (Glycogen Synthase Kinase 3); MEK (Mitogen-Activated Kinase/ERK Kinase); p70S6K (p70 ribosomal protein S6 Kinase); PDK1 (Phosphatidylinositol-trisphosphate-Dependent Kinase 1); PLA2 (PhosphoLipase A2); PLD (PhosphoLipase D); RSK (p90 Ribosomal protein S6 Kinase).

Die Interaktion von Ras mit den Effektorproteinen stimuliert deren katalytische Aktivität. So aktiviert z.B. die Kinase RAF ihrerseits die MAP (Mitogen-Activated Protein) Kinase Kaskade, was zur Aktivierung von ERK (Extracellular Regulated Kinase) führt. Substrate der Kinase ERK sind u.a. Transkriptionsfaktoren die zur ETS Familie gehören (Ets1, Ets2, PEA3, SAP1 and ELK1). Diese induzieren die Expression von Genen, die den Zellzyklus antreiben. Die PI3K generiert *second messenger* Lipide (PIP-3), die die Kinase AKT stimulieren. Diese phosphoryliert wiederum Proteine, die anti-apoptotische Funktionen ausüben, so dass die Aktivität der AKT Kinase für das Überleben der Zelle wesentlich ist. RALGDS Proteine sind Guanin-Nukleotid Austausch Faktoren für RAL (Ras related protein), ein Protein, das in Prozesse wie Vesikel Transport und Zellmorphologie involviert ist. Phospholipase C ϵ führt zur Aktivierung der Protein Kinase C und

mobilisiert die Freisetzung von Ca^{2+} , wodurch z.B. die Aktivität von Enzymen oder Ionenkanälen in der Zelle beeinflusst wird.

In primären Maus-Embryo-Fibroblasten (MEFs) führt konstitutiv aktives Ras, welches durch einen Aminosäure-Austausch von Glycin zu Valin an Codon 12 entsteht (Ras^{V12}), in Kombination mit einem weiteren Onkogen zur Transformation dieser Zellen, d.h. die Zellen wachsen unkontrolliert, zeigen keine Kontaktinhibition, wachsen in Softagar und bilden Tumore, nachdem sie transplantiert wurden (Land, 1983 #208). In humanen Zellen ist zusätzlich die Expression des Enzyms h-Tert (*human-Telomerase reverse transcriptase*) nötig, um Epithel- und Fibroblastenzellen zu transformieren (Hahn, 1999 #207).

1.2.1 Ras und Zellzyklus

Ras weist unterschiedliche Effekte auf den Zellzyklus auf. Diese sind abhängig vom Zelltyp als auch von der Expressionsstärke des Proteins (siehe Abschnitt 1.2.2).

So stimuliert Ras in immortalen Zellen die Zellteilung durch den RAF/MEK/ERK Signalweg, der Transkriptionsfaktoren wie c-Jun und Elk1 aktiviert. Elk1 führt zur Expression des Proteins c-Fos, das zusammen mit c-Jun den Transkriptionsfaktor AP1 (*Activator Protein 1*) bildet. Dieser führt zur Expression von c-Myc, dessen Zielgen u.a. Cyclin D ist. Cyclin D interagiert mit Cdk4 und Cdk6 und stimuliert den Eintritt der Zelle in den Zellzyklus (Pruitt, 2001 #180). Gleichzeitig wird der Zellzyklusarrest über die Aktivierung der Kinase AKT gehemmt. Die Kinase phosphoryliert die *Forkhead* Transkriptionsfaktoren (FKHR), wodurch diese inaktiviert werden (Vivanco, 2002 #182), so dass die Induktion des Zellzyklusinhibitors p27^{Kip1} ausbleibt.

In primären Zellen hingegen induziert Ras einen Zellzyklusarrest. Dieser wird ebenfalls über den RAF/MEK/ERK Signalweg vermittelt, jedoch führt dies zur Expression von p21^{Cip1} (Olson, 1998 #186), $\text{p16}^{\text{Ink4a}}$ (Serrano, 1997 #190), $\text{p15}^{\text{Ink4b}}$ (Malumbres, 2000 #8) und p19^{Arf} (Groth, 2000 #195; Palmero, 1998 #197). Die Expression von p21^{Cip1} , einem Zielgen von p53, wird neben p53 durch die Transkriptionsfaktoren Ets1/2 und C/EBP α/β aktiviert. Somit kann p21 auch unabhängig von p53 exprimiert werden (Park, 2000 #193; Zhang, 2003 #192). Die Aktivierung des RALGDS Signalweges hemmt hingegen die Expression von p21^{Cip1} (Olson, 1998 #186). Auch die Expression von $\text{p16}^{\text{Ink4a}}$ erfolgt über die Transkriptionsfaktoren Ets1 und Ets2, die an den Promotor von $\text{p16}^{\text{Ink4a}}$ binden und diesen aktivieren (Ohtani, 2001 #191). Der Mechanismus der In-

duktion von p19^{Arf} durch Ras ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es ist jedoch gezeigt, dass c-Myc die Expression von p19^{Arf} durch FoxO Transkriptionsfaktoren stimuliert (Bouchard, 2007 #380). Mit den erhöhten Expressionsleveln von p19^{Arf} steigen auch die Proteinmengen von p53 in Zellen mit aktivem Ras (Bates, 1998 #196; Palmero, 1998 #197). Die Induktion der Zellzyklusinhibitoren ist nötig, um Ras-vermittelten Zellzyklusarrest auszulösen.

Die Expression von p21^{Cip1} wirkt dem Ras-vermittelten Signal für verstärkte Zellproliferation entgegen, denn hohe Expressionslevel von Ras induzieren einen Zellzyklusarrest, der mit einer p21^{Cip1} Induktion einhergeht (Woods, 1997 #185; Pumiglia, 1997 #184; Kerkhoff, 1997 #183). Keratinozyten und epitheliale Zellen mit p21^{Cip1} Verlust und aktivem Ras entwickeln häufiger und schneller Tumore (Missero, 1996 #187). Bisher wurde angenommen, dass p21^{Cip1} und p27^{Kip1} negative Regulatoren des Zellzyklus sind, aber es gibt Hinweise, dass sie das Durchlaufen der G1-Phase auch positiv regulieren (Sherr, 1999 #188, Besson, 2008 #315, Dash, 2005 #313, Blain, 2008 #312). So fördert p21^{Cip1} die Zusammenlagerung von aktiven CyclinD1-Cdk4 Komplexen und verhilft dem Komplex zur Translokation in den Nukleus. Außerdem erhöht p21^{Cip1} die Stabilität des Komplexes (LaBaer, 1997 #189, Weiss, 2000 #311). Durch die Bindung von CyclinD1-Cdk4 Komplexen an p21^{Cip1} werden auch CyclinE-Cdk2 Komplexe freigestellt, so dass der Übergang von der G1-Phase in die S-Phase erfolgen kann (Pruitt, 2001 #180).

1.2.1.1 Zellzykluskontrolle

Zellen reagieren auf zytotoxischen, genomischen, replikativen oder oxidativen Stress mit der Aktivierung von Signalkaskaden. Die an der Signalkaskade beteiligten Kontrollproteine werden meist durch Phosphorylierung einer Kinase reguliert, wodurch unter anderem die Aktivierung von p53 (Arrest oder Apoptose) und die Inaktivierung von Cdk2 (Arrest) ausgelöst werden kann. In allen Zellzyklusphasen, G1-Phase, S-Phase, G2-Phase und Mitose-Phase, wird eine spezifische Schadenssignalkaskade aktiviert. Ist der Schaden so groß, dass er nicht repariert werden kann, lösen die Kontrollproteine einen permanenten Zellzyklusarrest (Seneszenz) aus oder eliminieren die Zelle durch Einleitung von programmiertem Zelltod (Apoptose) (Zhou, 2000 #139; Khanna, 2001 #140; Chang, 1999 #141). Damit wird die Integrität des Genoms gesichert und Mutationen verhindert, die zu unkontrolliertem Zellwachstum und Entartungen innerhalb eines Organismus führen würden.

Die Tatsache, dass die Wirkung vieler Chemotherapeutika durch Schädigung der DNA oder durch Blockierung der Replikation vermittelt wird, bringt die Kontrollproteine in einen therapeutischen Zusammenhang. Die Hemmung dieser Proteine sensitiviert jene Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika, die kein funktionelles p53 haben (Zachos, 2003 #142; Chen, 2003 #145; Wang, 2002 #144; Russell, 1995 #150; Shao, 1997 #149; Bunch, 1996 #148; Hsueh, 1998 #147; Akinaga, 1993 #146; Wang, 1996 #42; Koniaras, 2001 #143).

1.2.1.1.1 Die DNA-Schadensantwort

Die Behandlung der Zellen mit Cytarabin schädigt die DNA. Sensoren, die DNA-Doppelstrangbrüche und Replikationsgabeln, die in ihrem Fortschreiten behindert werden, detektieren, führen zur Aktivierung von zwei Kinasen, ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) und ATR (ATM- and Rad3-Related) (**Abb. 3**). Diese Proteine gehören zur Familie der PI3K (Phospho-Inositol 3 Kinase). Die Bezeichnung der Kinasen leitet sich von einem klinischen Syndrom, Ataxia Telangiectasia, ab. Dieses Syndrom ist durch eine erhöhte Sensitivität gegenüber Strahlung und ein verstärktes Auftreten von Tumoren charakterisiert. Die Kinasen ATR und ATM reagieren auf unterschiedliche Arten von DNA-Schäden (Abraham, 2001 #153; Shiloh, 2003 #151) und aktivieren jeweils die Effektorkinasen Chk1 und Chk2 durch Phosphorylierung. Doppelstrangbrüche (z.B. durch γ -Strahlung) aktivieren hauptsächlich die ATM-Kinase und Chk2, die in allen Phasen des Zellzyklus exprimiert werden, und führen in der beschädigten Zelle zu einem Arrest in der G1-Phase oder zur Apoptose. Replikationsdefekte aktivieren, durch das Auftreten einzelsträngiger DNA, die ATR-Kinase und Chk1 (Ball, 2005 #127; Cortez, 2001 #128; MacDougall, 2007 #129). Diese agieren in der S-Phase und G2/M-Phase des Zellzyklus. Auch ATR reagiert auf Doppelstrangbrüche, aber sehr viel langsamer als ATM.

ATR wird hauptsächlich durch Agenzien aktiviert, die mit dem Fortschreiten der Replikationsgabel interferieren, z.B. Cytarabin, UV-Strahlung und Hydroxyurea. Dabei entstehen einzelsträngige DNA Abschnitte. An diese bindet das Protein RPA (Replication Protein A) und rekrutiert das ATR-interagierende Protein (ATRIP) und ATR. Die Aktivierung von ATR benötigt die Zusammenlagerung vieler Proteine, was für die DNA-Schadensantwort unerlässlich ist (Kumagai, 2006 #344). ATR wiederum aktiviert die Kinase Chk1 durch Phosphorylierung an Serin 345 und Serin 317 (Zou, 2003 #154).

Für die vollständige Aktivierung des Signalweges sind zudem die Komplexe RAD9-RAD1-HUS1 und RAD17-RFC nötig (Rouse, 2002 #155).

Die Aktivierung von ATM wird durch Autophosphorylierung an Serin 1981, vermutlich durch Veränderungen in der Chromatinstruktur, herbeigeführt (Bakkenist, 2003 #156). Für die Funktionsfähigkeit von ATM ist ein Komplex, bestehend aus den Proteinen MRE11-RAD5-NBS1, nötig, der die DNA und die Kinase bindet (Petrini, 2003 #158; D'Amours, 2002 #157).

Neben Cytarabin werden auch Daunorubicin und Etoposid für die Behandlung der AML eingesetzt. Diese Substanzen bewirken Einzel- und Doppelstrangbrüche, wodurch die ATM- und ATR-Schadenssignalkaskade aktiviert wird (Montecucco, 2007 #361). Diese Substanzen hemmen das Enzym Topoisomerase II, welches die Struktur der DNA kontrolliert, indem es einen der beiden Doppelhelixstränge schneidet und den anderen Strang durch diesen hindurchführt. Diese Verwindungen der DNA-Stränge sind u.a. bei der Replikation und Rekombination notwendig. Das Enzym wirkt als Homodimer, wobei jeweils eine Einheit einen Strang der Doppelhelix schneidet. Durch Änderung der Konformation wird die intakte DNA durch den Bruch hindurchgeführt und die DNA-Enden wieder zusammengeführt. Das vorübergehende Zwischenprodukt, bestehend aus Topoisomerase II und geschnittener DNA, hat in hoher Konzentration cytotoxische Effekte. Etoposid hindert, durch direkte Interaktion mit dem Monomer, das Enzym an der Religierung der DNA, so dass es zu vielen Einzel- und Doppelstrangbrüchen kommt. Auch Daunorubicin hemmt die Topoisomerase II, wodurch es zur Aktivierung von p53 kommt (Laurent, 2001 #362).

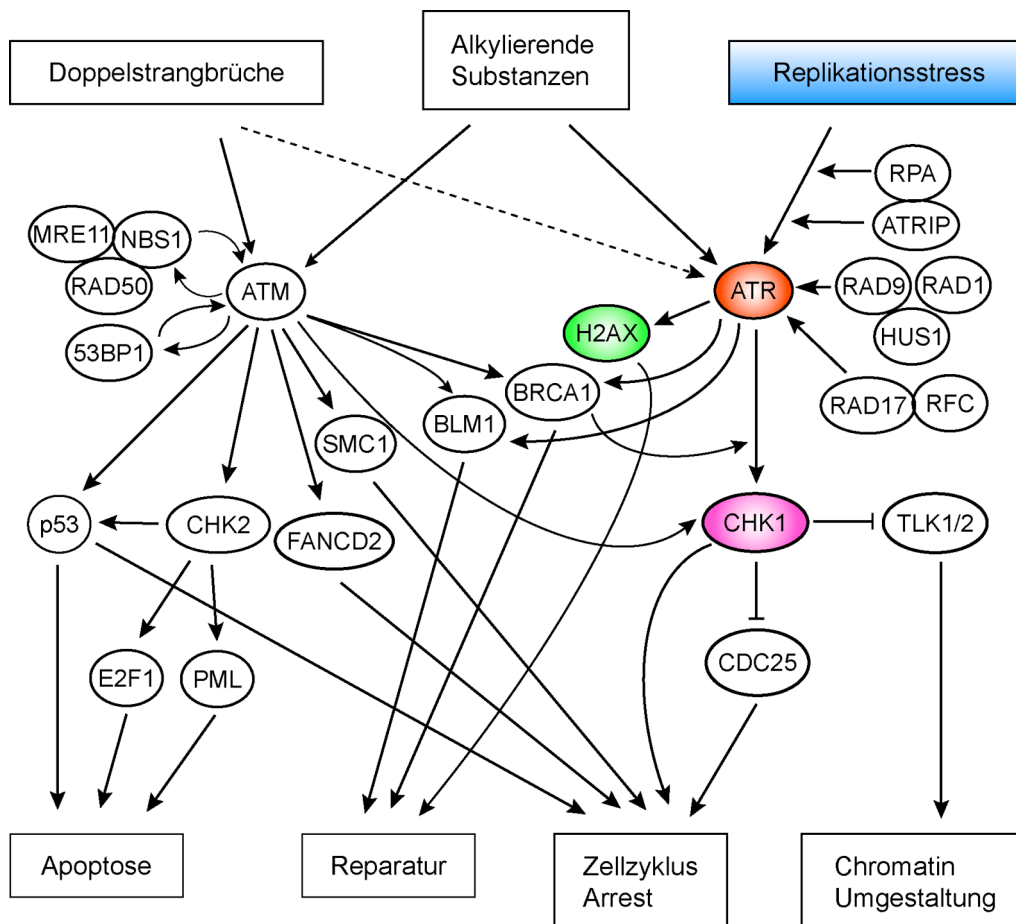


Abb. 3: Signalnetzwerk, das nach DNA-Schaden aktiviert wird. Es gibt zwei Signalkaskaden, die unterschiedliche Arten von DNA-Schaden detektieren und Apoptose, Reparatur bzw. Zellzyklusarrest induzieren. Die Kinase ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) wird durch Doppelstrangbrüche aktiviert. Dafür ist der MRN-Komplex (bestehend aus den Proteinen MRE11, NBS1 und RAD50) notwendig. ATM phosphoryliert und aktiviert die Kinase Chk2, die wiederum p53 phosphoryliert, so dass es zum Zellzyklusarrest in der G1-Phase kommt oder Apoptose induziert wird. Die Kinase ATR (*ATM- and Rad3-Related*) wird durch Replikationsstress aktiviert. Dabei entstehen einzelsträngige DNA Abschnitte, die von RPA (*Replication Protein A*) gebunden werden. Diese rekrutieren das ATR-interagierende Protein (ATRIP) und ATR, die nachfolgend die Kinase Chk1 aktivieren. Für die vollständige Aktivierung des Signalweges sind auch die Komplexe RAD9-RAD1-HUS1 und RAD17-RFC nötig. Chk1 phosphoryliert die CDC25-Phosphatasen, wodurch diese proteasomal abgebaut werden. Dadurch bleiben die Cyclin-abhängigen Kinasen inaktiv und es kommt zum Zellzyklusarrest.

Obwohl die Kinasen ATM und ATR durch unterschiedliche Signale aktiviert werden, führt die Aktivierung der einen Kinase auch zur Aktivierung des anderen Signalweges (Cuadrado, 2006 #12; Stiff, 2006 #13; Kulkarni, 2008 #52).

ATM/ATR und Chk1/2 setzen ein Netzwerk von Proteinen in Gang, die in DNA Reparatur, Regulation der Transkription, Replikation, Zellzykluskontrolle und Apoptose involviert sind. Zu diesen Effektor-Proteinen gehören BRCA1, FANCD2, NBS1, H2A.x, BLM1, p53BP1, CDC25 und p53 (Zou, 2003 #154; Shiloh, 2003 #151).

H2A.x ist eine Histon Variante, die in Säugerzellen 10% aller 2A-Histone ausmacht. Dieses Histon hat im C-Terminus einen exponierten Sequenzabschnitt, dessen Serin 139 in Folge eines DNA-Schadens von den Kinasen ATM und ATR phosphoryliert wird (γ -H2A.x) (Burma, 2001 #230; Ward, 2001 #231; Furuta, 2003 #241; Friesner, 2005 #234). Die Phosphorylierung von H2A.x markiert damit die Stelle an der die DNA beschädigt ist, wodurch es zur Rekrutierung von Reparaturproteine kommt. So bindet z.B. NBS1, ein Protein des MRN-Komplexes, an phosphoryliertes H2A.x und leitet damit die Ligation von gebrochenen Chromosomenenden ein. Die Reparaturproteine MCD1/NFBD1 und 53BP1 können in so genannten *nuclear foci*, die durch γ -H2A.x gebildet werden, detektiert werden (Bassing, 2004 #229).

1.2.1.1.2 Chk1 und Chk2

Die Effektorkinasen Chk1 und Chk2 sind strukturell unterschiedlich, zeigen aber überlappende Substratspezifität, so dass beide Proteine u.a. den Tumorsuppressor p53 und die Phosphatasen CDC25A und CDC25C phosphorylieren können (O'Neill, 2002 #161; Ou, 2005 #302; Shieh, 2000 #307).

Chk1 wird in der S- und G2-Phase von proliferierenden Zellen exprimiert, während quieszente und differenzierte Zellen keine oder nur eine sehr schwache Chk1 Expression aufweisen (Lukas, 2001 #172; Kaneko, 1999 #171). Die Aktivierung von Chk1 in der S-Phase des Zellzyklus verzögert die Replikation (Falck, 2002 #134; MacDougall, 2007 #129), stabilisiert die Replikationsgabel, verhindert Apoptose und blockiert den Eintritt in die Mitose. Dieser ist abhängig von Cdk1 (*Cyclin Dependent Kinase 1*), welches wiederum von den Phosphatasen CDC25A und CDC25C aktiviert wird. Aktiviertes Chk1 Protein phosphoryliert CDC25A an Serin 123 und CDC25C an Serin 216, welche daraufhin proteasomal abgebaut werden. Damit arretiert die Zelle in der G2-Phase des Zellzyklus (Sorensen, 2003 #130; Peng, 1997 #177). Der Übergang von der G1- in die S-Phase ist abhängig von Cdk2, das ebenfalls von CDC25A aktiviert wird. Durch den Abbau von CDC25A in diesen Phasen des Zellzyklus kommt es zum Arrest in der späten G1-Phase (Mailand, 2000 #174). Brustepithelzellen, heterozygot für Chk1, treten in die Mitose ein, noch bevor die DNA-Synthese abgeschlossen ist, was

zeigt, dass der Verlust eines Allels ausreicht, um DNA-Schäden auszulösen (Lam, 2004 #133).

Darüber hinaus sind noch weitere Funktionen von Chk1 bekannt. Das Protein induziert nicht nur Arrest und Reparatur nach Schädigung der DNA, es ist auch für den fehlerlosen Ablauf der Replikation erforderlich und in Chromatin *remodeling* involviert (Zhou, 2004 #36). Untersuchungen in Säuger- und Hefe Zellen zeigen, dass Chk1, neben der Stabilisierung der Replikationsgabeln, auch die Initiation und Elongation der Replikation an definierten Sequenzabschnitten (*origins of replication*) reguliert (Maya-Mendoza, 2007 #173; Nitani, 2006 #136; Conti, 2007 #137; Seiler, 2007 #138). Mit diesen zusätzlichen Funktionen könnte auch einhergehen, warum Chk1, im Gegensatz zu Chk2, in Säugerzellen essenziell für die embryonale Entwicklung ist. In der Maus führt der Verlust beider Chk1 Allele zu einer frühen embryonalen Letalität (Liu, 2000 #131; Takai, 2000 #132).

Chk2 ist, im Gegensatz zu Chk1, ein redundantes Kontrollprotein. Durch γ -Strahlung und UV-Strahlung wird dieses Protein sehr schnell aktiviert und kann Apoptose oder einen G1-Phase Arrest induzieren (Brown, 1999 #166; Chaturvedi, 1999 #160; Chen, 2005 #169 Chehab, 2000 #335). Beides vermittelt Chk2 über die Aktivierung von p53. Diese wird durch die Phosphorylierung von p53 im N-terminalen Bereich, u.a. an Serin 20, erreicht. Diese Phosphorylierung verhindert die Bindung der E3-Ubiquitin Ligase Mdm2, wodurch p53 nicht mehr abgebaut wird (Chehab, 1999 #325). Zusätzlich phosphorylieren und inaktivieren ATM und Chk2 auch das zu Mdm2-homologe Protein Mdmx, welches die proteasomale Degradation von p53 vermittelt (Chen, 2005 #324). Neben der Phosphorylierung im N-Terminus sind auch Stellen im C-terminalen Bereich von p53 beschrieben, deren Phosphorylierung durch Chk2 die Interaktion mit der Acetyltransferase p300 stabilisiert. Die Acetylierung von p53 führt zur Aktivierung des Proteins (Dornan, 2003 #333). Chk2 kann auch unabhängig von p53 Apoptose induzieren. Dies erfolgt durch die Phosphorylierung von PML und E2F-1 (Yang, 2002 #336; Stevens, 2003 #337).

1.2.2 Ras und Seneszenz

Seneszenz bezeichnet einen irreversiblen Zellzyklusarrest und wird ausgelöst, wenn die Zellen einem Stresssignal ausgesetzt sind. Viele Tumorzellen reagieren auf her-

kömmliche Zytostatika, wie z.B. Cytarabin und Etoposid, mit einem seneszenten Phänotyp, so dass Seneszenz, neben Apoptose, einen weiteren Mechanismus darstellt, der die Entwicklung von Tumoren im Organismus verhindert (Shay, 2004 #408). Seneszente Zellen verharren in der G1-Phase des Zellzyklus, sind metabolisch aktiv und zeigen die Aktivierung von Tumorsuppressor Signalwegen. Es gibt zwei Arten von Seneszenz, die replikative Seneszenz und die Onkogen-induzierte Seneszenz (OIS).

Die replikative Seneszenz limitiert die Anzahl der Teilungen einer Zelle und wird durch verkürzte Telomere ausgelöst. Telomere schützen die Chromosomen-Enden vor unvollständiger Replikation, homologer Rekombination und Verknüpfung nicht-homologer Enden. Bei jeder Zellteilung kommt es in somatischen Zellen zur Verkürzung der Telomere, da das Enzym Telomerase in diesen Zellen nicht exprimiert wird. Wenn die Telomere eine kritische Länge erreichen, wird ein DNA-Schadenssignal ausgelöst, das die Aktivierung von p53 zur Folge hat. p53 induziert daraufhin einen permanenten Zellzyklusarrest (Seneszenz) oder Apoptose.

Die Onkogen-induzierte Seneszenz ist unabhängig von der Telomerlänge und tritt in Zellen auf, die einem permanenten Stress ausgesetzt sind, z.B. durch ein konstitutiv aktives Onkogen. Onkogene veranlassen die Zelle zur Hyperreplikation, wobei es zu Schäden an der DNA kommt. Dies aktiviert die DNA-Schadenssignalkaskade, wodurch die Zellteilung innerhalb weniger Tage eingestellt wird (Di Micco, 2006 #1). OIS *in vitro* wurde erstmals für Zellen beschrieben, die mit aktivem Ras^{V12} infiziert wurden (Serrano, 1997 #190). Die Zellen zeigten einen Zellzyklusarrest, der Merkmale aufwies, die für replikative Seneszenz beobachtet wurden. So zeigten die Zellen die Aktivität des Enzyms Seneszenz-assoziierte-β-Galaktosidase (SA-β-Gal), der älteste und fundiertere Marker für Seneszenz. Dieses Protein wird in seneszenten Zellen verstärkt exprimiert, und seine Aktivität kann in den Zellen sichtbar gemacht werden (Dimri, 1995 #82). Auch die Zyklin-abhängigen Kinase Inhibitoren p15^{Ink4b} und p16^{Ink4a} sind in seneszenten Zellen induziert und gelten somit als Marker für diese Zellen (Collado, 2005 #201; Alcorta, 1996 #202; Prieur, 2008 #198). Auch für andere Onkogene wurde die Induktion von Seneszenz beschrieben, wie z.B. RAF, MEK, BRAF, CDC6, Cyklin E und STAT5 (Prieur, 2008 #198). Weitere Untersuchungen ergaben, dass in diesen Zellen durch Hyperreplikation eine DNA-Schadensantwort aktiviert wird, die kausal mit der OIS in Verbindung steht (Bartkova, 2006 #2; Di Micco, 2006 #1; Mallette, 2007 #204).

Ursprünglich hielt man OIS für ein Zellkulturartefakt, da die Zellen unter *in vitro* Bedingungen unphysiologischen Sauerstoffkonzentrationen (20%, anstatt 3-4%) ausgesetzt sind. Dass OIS *in vivo* ein Tumorsuppressormechanismus ist, wurde 2005 von vier Forschergruppen an Lungenadenomen, T-Zell-Lymphomen und Prostatatumoren bei Mäusen, sowie an humanen gutartigen Pigmentzellen der Haut (dysplastischer Nävus, auch Muttermal genannt) beschrieben (Braig, 2005 #4; Chen, 2005 #406; Michaloglou, 2005 #404; Collado, 2005 #201). Der erste direkte Beweis für Seneszenz in einem Wachstums-arrestierten humanen Tumor wurde am dysplastischen Nävus, der eine onkogene Aktivierung von BRAF aufweist, erbracht (Michaloglou, 2005 #404).

Eine *in vivo* Studie an Mäusen zeigt, dass die OIS von der Ras-Expressionsstärke abhängig ist (Sarkisian, 2007 #298): Die niedrige Expression eines Doxzyklin-induzierbaren onkogenen K-Ras Proteins in der Milchdrüse von transgenen Mäusen stimuliert die Zellteilung und führt zur epithelialen Hyperplasie, während eine hohe Ras-Expression in diesen Mäusen Seneszenz induziert, die vom Ink4/Arf-Genabschnitt abhängig ist. Die Ras-induzierte Seneszenz ist irreversibel und wird auch nach Abschalten der Ras-Expression aufrechterhalten.

1.2.3 Ras und Apoptose

Die Behandlung von Zellen mit Zytostatika (z.B. Cytarabin) löst den programmierten Zelltod (Apoptose) aus. Dies erfolgt zum einen durch Störung des Metabolismus und zum anderen durch die Erhöhung der Konzentration von pro-apoptotischen Proteinen. So hat z.B. die Induktion der DNA-Schadenssignalkaskade durch Cytarabin die Aktivierung von p53 zur Folge. Zielgene von p53 sind die pro-apoptotischen Bcl-2-Proteine Bid, Puma und Noxa, deren Transkription durch p53 aktiviert wird (Yu, 2001 #275; Sax, 2002 #276; Oda, 2000 #274). Zusätzlich kann p53 die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran auslösen (Moll, 2005 #279; Mihara, 2003 #277; Chipuk, 2004 #278). Die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran setzt Cytochrom C frei, wodurch es zur Bildung des Apoptosoms, bestehend aus Cytochrom C und Apaf-1, kommt. Dieser Komplex führt zur Spaltung von Pro-Caspase 9 zur aktiven Caspase 9 (Cain, 2000 #280). Das Substrat von Caspase 9 ist Pro-Caspase 3. Caspase 3 spaltet viele Substrate in der Zelle, so dass es zu den bekannten morphologischen Merkmalen der Apoptose, wie Zellschrumpfung, DNA Fragmentierung und Blasenbildung der Membran, kommt.

An der Übertragung von apoptotischen Signalen sind sowohl Kinasen als auch Transkriptionsfaktoren, z.B. JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*), MAPK/ERK oder NF- κ B (*Nuclear Factor κ B*), beteiligt (Karin, 2002 #282; Davis, 2000 #281).

Die Rolle von aktivem Ras bei der Apoptose ist abhängig vom Zelltyp und Kontext. Es gibt Daten, die darauf hinweisen, dass Ras ein anti-apoptotisches Signal in der Zelle auslöst (Terada, 2000 #259; Kinoshita, 1997 #258, Xue, 2000 #261; Mazzoni, 1999 #270), als auch Daten, die Ras-induzierte Apoptose belegen (Hueber, 1998 #256, Navarro, 1999 #264, Vos, 2000 #272).

1.2.4 Ras und Differenzierung hämatopoetischer Zellen

Bei der AML ist neben der oben beschriebenen Hyperproliferation die Differenzierung der hämatopoetischen Stammzelle zu reifen Granulozyten und Monozyten gestört.

Pluripotente hämatopoetische Stammzellen (HSC) machen ca. 0.1% der gesamten Zellpopulation im gesunden Knochenmark aus. Diese Zellen teilen sich asymmetrisch, d.h. nach der Teilung gibt es eine pluripotente Tochterzelle und eine unreife Vorläuferzelle (Progenitorzelle), die in ihrer Differenzierungslinie bereits festgelegt ist. Im Knochenmark differenzieren diese Vorläuferzellen weiter zu lymphoiden, erythroiden, megakaryozytischen oder myeloiden Zellen. Myeloide Zellen umfassen Vorläufer der Mono- und Granulozyten sowie deren reife Abkömmlinge. Die Vorläuferzellen zeigen eine starke Zellteilung und differenzieren in mehreren Schritten aus bis sie letztendlich die reifen, sich nicht mehr teilenden Zellen des Blutes bilden. An der Entwicklung von einer HSC zu einer Vorläufer- bzw. differenzierten Zelle sind Transkriptionsfaktoren beteiligt. Diese lassen sich in zwei Kategorien einteilen: 1. Transkriptionsfaktoren, die in beinahe allen Zelllinien eine Rolle spielen, wie SCL und AML1 und 2. Transkriptionsfaktoren, die spezifisch in bestimmten Differenzierungslinien exprimiert werden, wie z.B. GATA1, PU.1 und C/EBP α . Der Funktionsverlust dieser Transkriptionsfaktoren betrifft somit nur eine einzige Zelllinie oder eine kleine Anzahl von verwandten Zelllinien, während der Verlust von AML1 oder SCL die gesamten Blutzelllinien betreffen, da diese Transkriptionsfaktoren für die Entstehung der HSC aus dem Hämangioblast, dem Vorläufer für Blut- und Endothelzellen, erforderlich sind. Die Hochregulation des Transkriptionsfaktors PU.1 ist Voraussetzung für den Übergang einer HSC zu einer lymphoiden Vorläuferzelle, während seine Herunterregulation für die Differenzierung der myeloiden Vorläuferzelle zum MEP (Megakaryozyten/Erythrozyten Progenitor) nötig ist (**Abb. 4**). Die Hochregulation des Transkriptionsfaktors C/EBP α initiiert den Ü-

bergang vom myeloiden Vorläufer zum GMP (Granulozyten/Makrophagen Progenitor). Innerhalb der GMPs wird die Differenzierung zu Granulozyten bzw. Makrophagen durch die Expression von PU.1 und C/EBP α festgelegt, wobei C/EBP α die Funktion von PU.1 blockiert und damit die Differenzierung zu Granulozyten steuert (Reddy, 2002 #294). PU.1 reguliert myeloide Gene einschließlich der Rezeptoren für GM-CSF (Granuloocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor), M-CSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor) und G-CSF (Granuloocyte Colony-Stimulating Factor). Es handelt sich hierbei um Wachstums- und Überlebens-Faktoren, deren Rezeptoren ausschließlich auf myeloiden Zellen exprimiert werden. C/EBP α ist ein Leuzin-Zipper-Transkriptionsfaktor, der die Transkription der Rezeptoren für G-CSF und Interleukin-6 (IL-6) aktiviert. Für C/EBP α wurde auch gezeigt, dass er p21^{Cip1} aktiviert und den Transkriptionsfaktor E2F und die Zyklin-abhängigen Kinasen hemmt, so dass es zur Hemmung der Zellproliferation kommt (Tenen, 2003 #295).

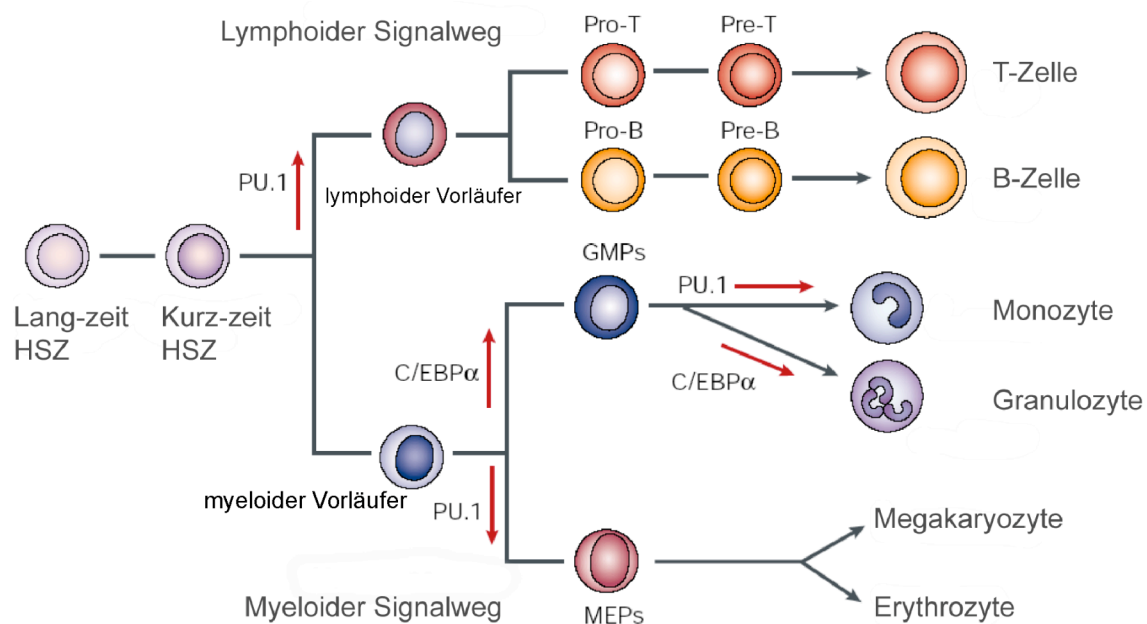


Abb. 4: Rolle der Transkriptionsfaktoren in der Hämatopoese. Transkriptionsfaktoren (TF) legen fest, in welche Zelllinie eine hämatopoetische Stamm- bzw. Vorläuferzelle differenziert. Wird der TF PU.1 in der HSC stark exprimiert, wird ein Genexpressionsprofil aktiviert, welches die Zelle in die lymphoide Linie differenzieren lässt. Ist die Expression von PU.1 innerhalb der myeloiden Vorläuferzellen niedrig, differenzieren die Zellen zu Megakaryozyten bzw. Erythrozyten aus. Der TF C/EBP α induziert in den myeloiden Vorläuferzellen die Differenzierung zu Granulozyten/Makrophagen Progenitoren (GMPs). In diesen Zellen führt die Aktivität von PU.1 zur Monozyten-Differenzierung. PU.1 kann von C/EBP α gebunden und damit inaktiviert werden. In dieser Situation kommt es zur Expression von C/EBP α Zielgenen, die zur Differenzierung in Granulozyten führen.

Aktives Ras kann die Differenzierung von Zellen beeinflussen. Die Infektion der myeloiden Zelllinie FDC-P1 mit onkogenem *RAS* löst eine Monozyten-Differenzierung *in vitro* aus (Hibi, 1993 #32). Humane Knochenmarkszellen, die mit mutiertem *RAS* infiziert sind, zeigen, neben verstärkter Zellteilung der Vorläuferzellen, eine Induktion der myeloiden Differenzierung. Onkogenes Ras allein ist in diesen Zellen nicht ausreichend, um die Zellen zu transformieren (Maher, 1994 #79). Um die Funktion von Ras *in vivo* zu studieren, wurden letal bestrahlten Mäusen Knochenmarkszellen injiziert, die onkogenes *RAS* trugen. Nach vier Wochen konnte eine granulozytäre Leukozytose im peripheren Blut der Mäuse detektiert werden, jedoch entwickelte keine der 22 transplantierten Mäuse in Langzeitstudien myeloische Neoplasien. Die Untersuchung der Knochenmarkszellen *in vitro* zeigte, dass onkogenes Ras die Bildung von Monozyten/Makrophagen fördert, und dass die Kultivierung dieser Zellen in Suspension die terminale Differenzierung zu Makrophagen auslöst. Diese Ergebnisse zeigen, dass aktivierende *ras* Mutationen keine genetischen Veränderungen sind, die eine AML initiieren, sondern eher als zweite zusätzliche Mutation auftreten und damit die Zellteilung von myeloiden Vorläuferzellen fördern, was schließlich zur Transformation führen kann (Hawley, 1995 #119).

Die Infektion der multipotenten Zelllinie FDCP-mix mit onkogenem Ras hemmt die Differenzierung der neutrophilen Granulozyten unter der Behandlung der Zellen mit G-CSF und GM-CSF, während die Differenzierung zu Makrophagen weiterhin induziert wird. Die Differenzierung der Neutrophilen kann jedoch teilweise durch Behandlung mit niedrigen Dosen Cytarabin herbeigeführt werden, was zeigt, dass Differenzierung durch Blockierung des Zellzyklus ausgelöst werden kann (Darley, 1999 #120). Die Induktion der Differenzierung durch Cytarabin ist auch in anderen Arbeiten beschrieben und weist damit einen zusätzlichen therapeutischen Mechanismus, neben Apoptose, von Cytarabin auf (Huang, 1988 #91; Nagler, 1986 #92; Takagaki, 2005 #9).

Onkogenes Ras induziert in vielen primären Zellen der Vertebraten Differenzierung wie z.B. in neuronalen Zellen, Adipozyten und, wie bereits erwähnt myeloiden Zellen. Ras initiiert dabei die Expression von p53, p15^{Ink4b}, p16^{Ink4a}, p19^{Arf} und p21^{Cip1}, was zur Differenzierung beiträgt. Überdies führt die Expression von *Sprouty1* und *Sprouty2*, Proteine die die Aktivierung von Ras blockieren, in NIH3T3 Fibroblastenzellen zur Hemmung des Zellwachstums und der Differenzierung. Aktives Ras kann also die Differenzierung von Zellen vermitteln (Gross, 2001 #24). Im Gegensatz dazu wird die Differenzierung

von Muskelzellen durch onkogenes Ras gehemmt (Crespo, 2000 #287; Shen, 2007 #121).

Wie sich aktives Ras auf die Zelle auswirkt, hängt, wie auch schon bei der Ras-induzierten Apoptose, unmittelbar vom Zelltyp und auch vom Kontext ab (primäre oder transformierte Zellen, weitere Onkogene, Wachstumsfaktoren). Auf der einen Seite fördert Ras die Zellteilung, auf der anderen Seite kann aktives Ras auch Differenzierung induzieren. Der Ras-induzierte Zustand der Zelle hängt von der Menge der Ras-Proteine ab, welche in der Zelle exprimiert werden. In primären humanen hämatopoetischen Vorläuferzellen, die aktives Ras tragen, führen große Mengen des Proteins zur Reduktion der Zellteilungsrate und verstärkter Differenzierung zu Monozyten/Makrophagen, während die Behandlung mit Farnesyltransferase-Inhibitoren und eine moderate Ras-Aktivität die Zellteilung verstärkt und die Teilung primitiver Zellen (*self-renewing cells*) fördert (Dorrell, 2004 #30).

1.3 CALGB-Studie 8525

Die CALGB-Studie 8525 stellte die Frage, ob eine hochdosierte Cytarabintherapie für Patienten mit akuter myeloischer Leukämie in der Postinduktionstherapie von Vorteil ist. Hierfür wurden AML-Patienten, die durch eine Standard Daunorubicin-Cytarabininduktionstherapie in Vollremission gekommen waren (ein oder zwei Zyklen), in drei Arme randomisiert: 3.000 mg/m² Cytarabin; 400 mg/m² Cytarabin und 100 mg/m² Cytarabin. Es stellte sich heraus, dass für Patienten mit akuter myeloischer Leukämie, die durch eine Daunorubicin-Cytarabin-Doppeltherapie in Remission gekommen waren, eine hochdosierte Cytarabintherapie nicht nur das Rezidivrisiko senkt, sondern auch das gesamte Überleben verlängert (Mayer, 1994 #397).

Diese Studie war Ausgang für eine Publikation, bei der retrospektiv die Rolle von RAS-Mutationen bei der akuten myeloischen Leukämie untersucht wurde. Hierfür wurden 99, überwiegend aus dieser Studie stammende Proben auf Präsenz onkogener RAS-Mutationen untersucht und mit dem Ansprechen auf Chemotherapie und anderen klinischen Parametern korreliert. Es zeigte sich eine Tendenz zu einem besseren Überleben, welche aber nicht signifikant war. Um die Daten zu untermauern, wurde die Probenanzahl erhöht und 185 Patienten der CALGB-Studie 8525 auf Präsenz onkogener RAS-Mutationen untersucht. Diese Daten wurden dann mit der Rezidivwahrscheinlich-

keit korreliert. Das mittlere *follow-up* dieser Patienten betrug 12,9 Jahre, so dass die Frage nach der prognostischen Relevanz durch die lange Dauer der Nachbeobachtung sehr gut untersucht werden konnte.

Diese retrospektive Analyse zeigte, dass Patienten mit *RAS*-Mutationen, welche in den Niedrig-Cytarabinarm (100 mg/m^2 , Low-Dose AraC, *LDAC*) randomisiert wurden, nach 6 Jahren alle rezidiert waren, während bei Patienten ohne *RAS*-Mutation die Dosis-escalation eine leicht geringere Rezidivwahrscheinlichkeit brachte. Der beste Arm war der Arm der Patienten mit onkogenen *RAS*-Mutationen, welcher randomisiert Hochdosis-Cytarabin (400 mg/m^2 und 3000 mg/m^2 , High Dose AraC, *HDAC*) erhalten hatte. Diese Patienten profitierten am deutlichsten von der Cytarabin-Dosiseskalation (**Abb. 5.**)

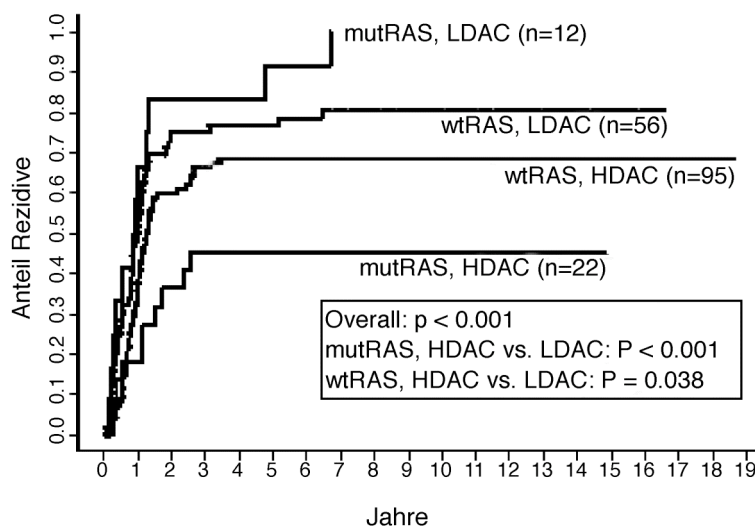


Abb. 5: Hochdosis-Cytarabin Behandlung (HDAC) führt zu weniger Rezidiven in Patienten mit mutiertem *RAS*. Das Kaplan-Meier Diagramm stellt die Häufigkeit des Auftretens von Rezidiven in Abhängigkeit des *RAS*-Status und der Cytarabin Behandlung, über einen Zeitraum von 19 Jahren, dar. Von den 185 Patienten, die in diese Studie eingingen, weisen 34 Patienten (18%) *RAS*-Mutationen auf (Neubauer, 2008 #66).

Statistisch stellte sich auch eine Interaktion der onkogenen *RAS*-Mutation mit der Dosis-escalation dar. Diese Interaktion war multivariat getestet wichtiger als der bisher wichtigste prognostische Parameter, die Zytogenetik (**Abb. 6**). Der *Forest plot* zeigt, dass in Bezug auf ein erneutes Auftreten der Erkrankung eine Abhängigkeit zwischen der Variablen mutiertes *RAS* und der Variablen Cytarabin-Dosierung besteht (*Hazard*

ratio: 0,28). Eine solche Interaktion ist bei wildtyp *RAS* Patienten nicht vorhanden (*Hazard ratio*: 0,67). Während Patienten mit mutiertem *RAS* von Hochdosis-Cytarabin profitieren, ist dieser Effekt unabhängig vom zytogenetischen Hintergrund (*Hazard ratio*: 0,42), der sich auf den Transkriptionsfaktor CBF bezieht.

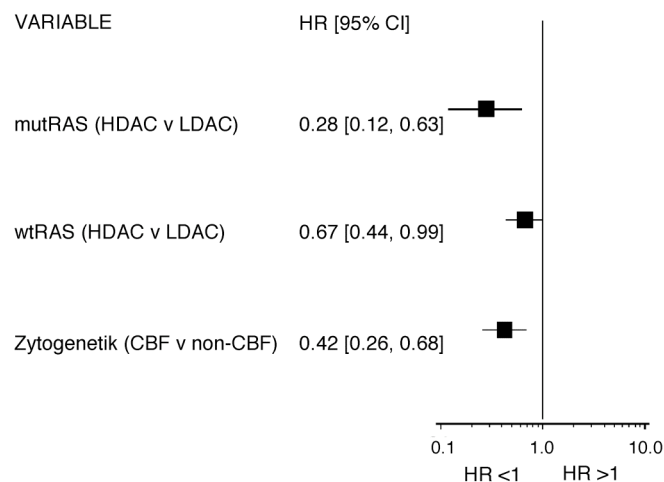


Abb. 6: Der Effekt von mutiertem *RAS* ist unabhängig von der Zytogenetik der AML. Der Graph zeigt das Ergebnis einer multivariaten Analyse, mit den Faktoren *RAS*-Status, Cytarabin-Dosierung und CBF-Status. Es wurde das Zusammenwirken dieser Variablen und ihre Abhängigkeitsstruktur zueinander bestimmt. Die *Hazard ratio* (HR) gibt das Verhältnis der Gruppen zueinander an. Bei einer HR von 1,0 besteht kein Unterschied zwischen den jeweiligen Gruppen. Je kleiner die HR, desto signifikanter der Unterschied zwischen den Gruppen. HDAC = *High Dose AraC* (Hochdosis Cytarabin); LDAC = *Low Dose AraC* (Niedrigdosis Cytarabin); CBF (*core binding factor*), ein Transkriptionsfaktor der in der AML, durch die Inversion des Chromosoms 16, häufig mutiert ist und in dieser Auswertung als Marker der Zytogenetik verwendet wurde.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die CALGB 8525 Studie zeigt eine Interaktion zwischen Cytarabin-Dosis und *RAS* Status. Patienten profitieren am meisten, wenn ihre Tumorzellen *RAS* Mutationen aufweisen und sie mit Hochdosis-Cytarabin therapiert werden. In dieser Patientengruppe kommt es zu signifikant weniger Rückfällen der Erkrankung. Daraus ergeben sich zwei Fragen:

1. Kann eine Interaktion zwischen Cytarabin und onkogenem *RAS* nachgewiesen werden und

2. wenn ja, durch welche molekularen Mechanismen vermittelt *RAS* diesen Effekt.

Ziel dieser Arbeit ist es, innerhalb eines Zellsystems, welches als Modell für akute myeloische Leukämie herangezogen werden kann, Kontroll- und *RAS*^{V12}-infizierte Zellen zu generieren. Nachfolgend soll der Effekt von Cytarabin auf die beiden Zelllinien untersucht werden. Da nach den Daten aus der *CALGB*-Studie zu erwarten ist, dass sich die Zelllinien hinsichtlich der Behandlung mit Cytarabin unterscheiden, werden die molekularbiologischen Mechanismen und die zellbiologischen Merkmale der Zellen charakterisiert. Dazu werden die Zellen mit unterschiedlichen Cytarabin-Dosierungen behandelt und die Auswirkungen auf Zellüberleben, Seneszenz und Apoptose untersucht. Parallel wird die Aktivierung von Tumorsuppressoren und der DNA-Schadensignalkaskade, die durch die Behandlung induziert wird, mit biochemischen Methoden überprüft. Durch die Erforschung, wie onkogenes *RAS* eine effektivere Cytarabin-Behandlung vermittelt, kann nach Substanzen gesucht werden, die diesen Effekt auch in Kontroll-Zellen mit wildtyp *RAS* erzielen.

2 Material

2.1 Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben wurden sämtliche Chemikalien mindestens in der Qualitätsstufe „zur Analyse“ von den Firmen Sigma-Aldrich (München), Merck (Damstadt), Acros Organics und Roth bezogen. Feinchemikalien mit höchstem Reinheitsgrad wurden entweder von Sigma (Deisenhofen) oder Gibco-Life Technologies verwendet.

Agar, Bactopeptone	BD Biosciences
TEMED	Invitrogen
Agarose	Seakem LE
Methanol	Fisher Scientific
Ethanol	KTM optichem
Tween	Appllichem
HOECHST (4,6-Damidino-2-Phenylindol)	Sigma (5 mg/ml)
DABCO (1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane)	Sigma
MOWIOL-488 (Polyvinylacetat)	Carl Roth
K ₃ Fe(CN) ₆	Sigma (50 mM in H ₂ O)
K ₄ Fe(CN) ₆	Sigma (50 mM in H ₂ O)
MgCl ₂	Sigma (1 M in H ₂ O)

2.2 Puffer und Lösungen

Sofern nicht anders angegeben wurden die Lösungen mit ddH₂O angesetzt.

2.2.1 Zellkulturlösungen

PBS pH 7,4	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10,1 mM Na ₂ HPO ₄ 1,76 mM KH ₂ PO ₄
Trypsin/EDTA	89% kaltes 1x TBS 10% 10x Trypsin 1% 0,5 M EDTA
2x HBS	280 mM NaCl

Material

	1,5 mM Na ₂ HPO ₄ 50mM Hepes-KOH
Trypanblau (Sigma)	0,75% (w/v) in PBS
Polybren (Sigma)	Stammlösung 4 mg/ml
DMSO (Merck)	Fertiglösung
Cytarabin (Merck)	411 mM Cytosinarabinosid (100 mg/ml, hergestellt von der Zentralen Zytostatika Zubereitung des Klinikums Marburg)
May-Grünwald (Sigma)	Fertiglösung
Giemsa (Sigma)	Fertiglösung
INT (Fluka)	Iodonitrotetrazoliumchlorid 10 mg/mL in 100% Ethanol (bei -20 °C lagern)
X-Gal (Carl Roth)	20 mg/ml in DMF (bei -20 °C lagern)

2.2.2 Proteinbiochemische Lösungen

2.2.2.1 Lyse-Puffer

TNN	50 mM Tris-HCl 120 mM NaCl 5 mM EDTA 0,5% NP-40 10 mM Na ₂ P ₂ O ₇ 2 mM Na ₃ VO ₄ 100 mM NaF einstellen des pH-Wertes auf pH 7,5 mit HCl. Proteaseinhibitor Cocktail 1:200; 1 M DTT 1:1000 (frisch zugeben)
NP-40	50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 1% NP-40 einstellen des pH-Wertes auf pH 8
Ripa	10 mM NaPO ₄ , pH 7.2 150 mM NaCl 1% NP-40 0.1% Sodium Deoxycholate 0.1% SDS

2.2.2.2 Inhibitoren (Sigma)

Proteinaseinhibitor	Protease Cocktail; angesetzt 20 mg/ml gelöst in DMSO. Eingesetzt 1:1000
Phosphataseinhibitoren	Cocktail I (Serin/Threonin-Phosphatasen) Cocktail II (Tyrosin-Phosphatasen)

2.2.2.3 Puffer für Western-Blot

3x SDS Probenpuffer	187,5 mM Tris-HCl pH 6,8 6% (w/v) SDS 30% (w/v) Glycerin 0,03% (w/v) Bromphenolblau 2 M β -Mercaptoethanol Aqua sterile (bei -20 °C lagern)
10x Tankblot-Puffer	1,92 M Glycin 0,25 M Tris-Base ddH ₂ O
SDS-PAGE Laufpuffer	25 mM Tris-HCl, pH 8,3 250 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS
20x TBS	1 M Tris-HCl, pH 7,4 3 M NaCl
TBST	1x TBS 0,2% (v/v) Tween-20
Blockmilch	5% (w/v) Magermilchpulver in TBS-T
Ammoniumpersulfat	10% (w/v) in H ₂ O (Sigma)
Stripping-Puffer	62,5 mM Tris-HCl pH 6,8 2% SDS 0,1 M β -Mercaptoethanol

2.2.2.4 Lösungen und Puffer für die Immunfluoreszenz

Waschpuffer	PBS/0,1 M Glyzin PBS/0,1% NP-40
Blockierlösung	PBS / 0,1% NP-40 / 5% FCS
pFA	3,7% para-Formaldehyd (bei -20 °C lagern)

Eindeckmedium	6 g Glyzerin 2,4 g Mowiol 4-88 (Polyvinylalkohol) 6 ml dH ₂ O 12 ml 0,2 M Tris-HCl, pH 8,5 25 mg/ml DABCO
---------------	--

2.2.2.5 Sonstige Lösungen

TAE	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA, pH 8
6x DNA-Ladepuffer	40% (w/v) Saccharose 0,2% (w/v) Bromphenolblau 0,2% (w/v) Xylenxyanol 10 mM EDTA, pH 8
M-MLV Puffer	250 mM Tris-HCl, pH 8,3 275 mM KCl 15 mM MgCl ₂ angesetzt in DEPC-H ₂ O
DEPC-H ₂ O	0,1% (v/v) Diethylpyrocarbonat in ddH ₂ O über Nacht bei RT rühren; auto- klavieren.
DTT (Dithiothreitol)	0,1 M in DEPC-H ₂ O
Tris-HCl	1 M Tris-HCl in ddH ₂ O, pH 8

2.2.2.6 Stammlösungen

Bradford	Quick Start Bradford Dye Reagenz (Bio-Rad)
Acrylamidstammlösung	30% (w/v) Acrylamid 4K (AppliChem)
Ethidiumbromid	10 mg/ml in H ₂ O (AppliChem)
dNTPs	100 mM Set (Carl Roth) eingesetzt: 10 mM in DEPC-H ₂ O
Glycogen „RNA-Grade“	20 mg/ml (Fermentas)
Entwicklerlösung	Immobilon Western (Millipore)

2.3 Zelllinien und Bakterienstämme

2.3.1 Säuger-Zellen

MLL-ENL-ER	Murine hämatopoetische Stammzellen; mit OHT-induzierbarem MLL-ENL immortalisiert.
Phoenix ^{Eco}	Humane, ekotrophen-Retrovirus-produzierende Zelllinie

2.3.2 Bakterienstämme

DH5 α	<i>E.coli</i> cup E44 lacU160 (80lacZM15) hsd17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1
--------------	--

2.4 Medien

2.4.1 Zellkulturmedien

Vollmedien	RPMI 1640 + GlutaMAX (Gibco) DMEM + GlutaMAX (Gibco)
Methylzellulose	Methocult M3234 (Stemcell Technologies Inc)
Serum	Foetal Bovine Serum EU Approved Origin (Gibco)

2.4.1.1 Antibiotika

Pen/Strep	Penicillin (10.000 U/ml) Streptomycin (10 mg/ml) (von PAA)
Puromycin	10 mg/ml (Invivogen)
Blasticidin	10mg/ml (Invivogen)
Neomycin (Pulver)	200 mg/ml in H ₂ O (Invitrogen)
Hygromycin (Pulver)	406 mg/ml (Calbiochem)

2.4.1.2 Zusätze

4-OHT	4-Hydroxytamoxifen (Sigma) 1 mM Stammlösung in abs. Ethanol (bei -20°C lagern)
Zytokine (CellSystems)	mSCF, 100 µg/ml Stammlösung in DEPC-Wasser mGM-CSF, 10 µg/ml Stammlösung in DEPC-Wasser mIL-3, 10 µg/ml Stammlösung in DEPC-Wasser mIL-6, 10 µg/ml Stammlösung in DEPC-Wasser (bei -20°C lagern)

2.4.2 Bakterienmedien

LB-Medium	1% Trypton 0,5% Hefeextrakt 1% NaCl Aqua dest pH 8
LB-Agar	LB-Medium 1,5% (w/v) Bacto-Agar

2.4.2.1 Antibiotika

Ampicillin	Stammlösung 100 mg/ml (eingesetzt: 1:1000)
------------	---

2.5 Expressionsplasmide

pMSCV	Muriner Stammzellvirus-Vektor von Clontech, mit PKG-Promotor und veränderter 5'-LTR Verfügbar mit den Resistentgenen: Puromycin Neomycin Hygromycin Blasticidin (generiert aus Puromycin-Vektor)
-------	---

pMSCV-blasti-RasV12	Konstitutiv aktives H-Ras durch Punktmutation G12V. In pMSCV-Blasticidin mit EcoRI kloniert
pMSCV-puro-RasV12	Konstitutiv aktives H-Ras durch Punktmutation G12V. In pMSCV-Puromycin mit EcoRI kloniert
pMSCV-H2B-GFP	pMSCV Vektor, dessen Puromycin Kasette gegen H2B-GFP mittels der Enzyme ClaI/HindIII ausgetausch wurde

2.6 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide sind mausspezifisch. Sie wurden mit Hilfe von *Primer3* designed und von der Firma Metabion (Martinsried, Deutschland) synthetisiert. Alle Primer wurden in gelöstem Zustand in einer Konzentration von 100 pmol/μl bestellt.

2.6.1 qRT-PCR Primer

Ly6G/C (Gr1)	fwd: 5'-tacctgcccttctctgatg-3' rev: 5'-gggaaggcagagattgctc-3'
CD11b (Mac1)	fwd: 5'-cacgcagacaggaagtacca-3' rev: 5'-ccagcaagggaccattagag-3'
S16	fwd: 5'-aggagcgatttgctggtgtg-3' rev: 5'-gctaccagggccttgagat-3'
Noxa	fwd: 5'-gtcgcaaaagagcaggatg-3' rev: 5'-agcacactcgtccttcaagtc-3'
Dec1	fwd: 5'-ggattttgcccatgtacc-3' rev: 5'-ggtgcggcagtttgaagtt-3'
p15 ^{Ink4b}	fwd: 5'-tgcagatgatccacaggcta-3' rev: 5'-gtgaatccccacacatgaca-3'
CD117 (c-kit)	fwd: 5'-ggagcccacaatagattggtat-3' rev: 5'-cactggtgagacaggagtgg-3'

2.6.2 Sequenzierprimer

pMSCV	Fwd: 5'-cccttgaacctcctcgttcgacc-3' Rev: 5'-gagacgtgctacttccatttgc-3'
-------	---

2.6.3 RT-PCR Primer zur Expressionsanalyse von MLL-ENL

Bindet ab 4025 in MLL
ENL 1680-1660

Fwd: 5'-gcaaacagaaaaaagtggtccccc-3'
Rev: 5'-tcattgtggccacggcctccag-3'

2.6.4 Primer für cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte mit einem Primer-Mix aus randomisierten Hexameren von der Firma Roche.

2.7 Kits

qRT-PCR Mix	Immomix (Bioline)
Maxi-/Minipräparation	Jetstar 2.0 (Genomed)
Gelaufreinigung	QIAEX® II (Quiagen)
Guanidinium Thiocyanat-Phenol-Chloroform Extraktion	peqGold Trifast (peqLab)
Comet-Assay	CometAssay™ (Trevigen)
BrdU-FACS	BrdU Flow Kits (BD Pharmingen™)
Caspase-FACS	<i>FITC-conjugated monoclonal active Caspase-3 Antibody Apoptosis Kit I</i> (BD Pharmingen)
Ras Aktivierungsassay	<i>Ras Activation Assay Kit</i> (Millipore)

2.8 Enzyme und Standards

2.8.1 Enzyme

RNase-Inhibitor	Riboblock, 40 U/μl (Fermentas)
M-MLV RT	200 U/μl (Invitrogen)
Phosphatase	Calf Intestine Alkaline Phosphatase, 1 U/μl (Fermentas)
T4-DNA Ligase	5 U/μl (Fermentas)
Sall	1500 U (Fermentas)

EcoRI	5000 U (Fermentas)
BglII	2500 U (Fermentas)
BamH1	4000 U (Fermentas)
XhoI	2000 U (Fermentas)
HindIII	5000 U (Fermentas)
HphI	1500 U (Fermentas)
Bsu15I	3000 U (Fermentas)

2.8.2 Molekulargewichtstandards

1 kb DNA Marker	1 kb DNA <i>Ladder</i> 1 µg/µl (Invitrogen)
Proteinmarker	<i>PageRuler Prestained Protein Ladder</i> (Fermentas)

2.9 Antikörper

2.9.1 Primäre Antikörper

anti-p21 ^{Cip1} (M-19)	Polyklonaler Kaninchenantikörper (Santa Cruz) 1:1000 für Westernblot in 5% Milch
anti-Ras	Monoklonaler Mausantikörper (BD) 1:2000 für Westernblot in 5% Milch
anti-Chk1 (FL-476)	Polyklonaler Kaninchenantikörper (Santa Cruz) 1:1000 für Westernblot in 5% Milch
anti-phospho-Chk1 (Ser345)	Polyklonaler Kaninchenantikörper (Cell Signaling) 1:10 (auf 1 Mio Zellen) für FACS 1:1000 für Westernblot in 5% BSA
anti-phospho-Chk1 (Ser345); 133D3	Monoklonaler Kaninchenantikörper (Cell Signaling) 1:2000 für Westernblot in 5% BSA
anti-p16 ^{Ink4a}	Polyklonaler Mausantikörper (Santa Cruz) 1:1000 für Westernblot in 5% Milch
anti-p-Erk (E-4)	Monoklonaler Mausantikörper (Santa Cruz) 1:2000 für Westernblot in 5% Milch

anti-pATM (Ser1981)	Monoklonaler Mausantikörper (Chemicon) 1:1000 für Immunfluoreszenz
anti-pH2A.X (Ser139)	Polyklonaler Kaninchenantikörper (Cell Signaling) 1:1000 für Westernblot in 5% Milch 1:200 für Immunfluoreszenz
anti-p19 ^{Arf} (R562)	Polyklonaler Kaninchenantikörper (Abcam) 1:1000 für Westernblot in 5% Milch
anti-p53 (CM5)	Polyklonaler Kaninchenantikörper (Novocastra) 1:1000 für Westernblot in 5% Milch
anti-Cdk2 (M2)	Polyklonaler Kaninchenantikörper (Santa Cruz) 1:20.000 für Westernblot in 5% Milch

2.9.2 Sekundäre Antikörper

anti-Maus	Anti-Maus IgG, Schafantikörper an Meereschweinechsenperoxidase gekoppelt, NA 931 (GE-Healthcare) 1:5000 für Westernblot
anti-Kaninchen	Anti-Maus IgG, Eselantikörper an Meereschweinechsenperoxidase gekoppelt, NA 931 (GE-Healthcare) 1:5000 für Westernblot
anti-Maus Alexa Fluor 488	Alexa Fluor 488-gekoppelter Mausantikörper (Invitrogen) 1:5000 für Immunfluoreszenz
anti-Kaninchen Alexa Fluor 488	Alexa-Fluor 488-gekoppelter Mausantikörper (Invitrogen) 1:100 (20 µg) auf 1 Mio Zellen für FACS

2.9.3 Antikörper für FACS

anti-Ly6G/C (Gr1) - PE	PE-gekoppelter monoklonaler Rattenantikörper (BD Pharmingen™) 1:100 (1 µg) pro 1 Mio Zellen
anti-Ly6G/C (Gr1) - FITC	FITC-gekoppelter monoklonaler Rattenantikörper (BD Pharmingen™) 1:100 (1 µg) pro 1 Mio Zellen

anti-CD11b (Mac1) – FITC	FITC-gekoppelter monoklonaler Rattenantikörper (BD Pharmingen™) 1:100 (1µg) pro 1 Mio Zellen
anti-CD11b (Mac1) – PE	PE-gekoppelter monoklonaler Rattenantikörper (BD Pharmingen™) 1:100 (1µg) pro 1 Mio Zellen
F _c -Block (Fcγ III/II Rezeptor), CD16/CD32	Monoklonaler Rattenantikörper (BD Pharmingen™) 1:2000 pro 1 Mio Zellen

2.10 Einmal- und Plastikware

6- <i>well</i> und 96- <i>well</i> Platten	Greiner Bio-One, Cellstar
24- <i>well</i> Platten	Nunc
Pipettenspitzen	StarLab
15 ml und 50 ml Reaktionsgefäße	Greiner Bio-One, Cellstar
1,5 ml und 2 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf
MicroAmp Optical Tubes	Applied Biosystem
PVDF Transfer Membran für Proteine	Millipore
ECL Hyperfilm	Amersham
Gel-Blotting Papier	Schleicher und Schuell
Einmal-Skapell	Feather
Frischhaltefolie	Saran
Kryoröhrchen zum Einfrieren von Zellen	Greiner Bio-One, Cellstar

2.11 Geräte

Begasungsbrutschränke	Heraeus BBD 6220
Neubauerzählkammer improved, 0,100 mm Tiefe, 0,0025 mm ² Fläche	Assistent, Germany
Sterilarbeitsbank	Heraeus HeraSafe
FACScalibur	Becton-Dickinson

Material

BDPathway 855 Bioimager	Becton-Dickinson
NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer	Thermo Scientific
Primus 96 Plus Thermal Cycler	MWG-Biotech
Ori-Block 08-3 und 08-1	Techne
Schüttler 3015	GFL
Rührer	REO
MXp3000P qPCR System, mit MxPro qPCR-Software	Stratagene
Wasserbad	GFL
Mikroskop Axiovert 40C	Zeiss
Pipetboy AcuJet Pro	Braun
Pipetten	Gilson
Photometer Ultrospec 2000	Pharmacia Biotech
Biofuge pico	Heraeus
Biofuge fresco	Heraeus
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf
Megafuge 1,0 R	Heraeus
Entwicklermaschine	Kodak X-OMAT 2000 Processor
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Mikrowelle	LG
Power Supply	BioRad
Tankblot-Apparatur	Harnischmacher
Einsätze für Zytospin	Heraeus
Mikroskop Leica DMLB mit der Leica DFC420 Kamera und der Leica DFC Twain Software	Leica Microsystems, Schweiz

Material

Binokular MZ 125
mit Kamera Leica DC 300

Leica Microsystems, Schweiz

Polyacrylamidgelapparatur
Biorad Mini-Protean
Tetra Elektrophorese System

Biorad

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

3.1.1.1 Kultivierung der Phoenix^{Eco}-Zellen

Die Zellen wurden bei 37 °C, 5% CO₂ und 100% relativer Luftfeuchtigkeit im Inkubator kultiviert. Das Vollmedium enthielt 10% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin.

Phoenix^{Eco} Zellen sind adherente Zellen. Die Kultivierung erfolgte auf Polystyrol-Kulturschalen in DMEM + GlutaMax Vollmedium. Bei einer 70%-igen Konfluenz wurde Trypsin auf die Zellen gegeben und nach der Inkubation für 1 min bei 37 °C die Zellen resuspendiert. Ein Teil dieser Zellsuspension wurde auf eine neue Platte mit frischem Medium gegeben. Zweimal im Jahr wurden die Phoenix^{Eco} Zellen mit 400 µg/ml Hygromycin und 1 µg/ml Diphtheria Toxin für mindestens eine Woche (bis zu zehn Tagen) behandelt, um auf die *gag*, *pol* und *env* Konstrukte zu selektionieren.

3.1.1.1.1 Transfektion der Phoenix^{Eco}-Zellen

Mit Hilfe von Kalziumphosphat-Präzipitaten können Fremdgene in Zellen eingeschleust werden. Wird eine Kalziumlösung mit einer Phosphatlösung vermischt, so fällt das Kalzium als mikroskopisch sichtbares Präzipitat aus. Durch die Zugabe von DNA zur Kalziumlösung, fällt die DNA aufgrund ihrer Phosphatgruppen mit aus (Chen and Okayama, 1987; Wigler et al., 1979). Die Aufnahme der Präzipitate in die Zellen erfolgt durch Phagozytose (Loyter et al., 1982). Einen Tag vor der Transfektion wurden 6x10⁶ Phoenix^{Eco}-Zellen auf eine 10 cm Schale ausplattiert, so dass sie am Tag der Transfektion ca. 70 - 80% konfluent waren.

Um die DNA-Kalziumphosphat Präzipitate herzustellen wurde 1 ml 2x HBS in einem 15 ml Reaktionsgefäß vorgelegt. In einem Eppi wurden folgende Komponenten zusammen pipettiert:

Plasmid-DNA	20 µg
50 µM Chloroquin	5 µl
2,5 M CaCl ₂	100 µl
H ₂ O	ad 1 ml

Die DNA-Kalziumchlorid-Mischung wurde tropfenweise unter vortexen zu der 2x HBS-Lösung zugegeben. Anschließend wurde das Gemisch vorsichtig auf die Zellen pipetiert. Nach ungefähr 16 h wurden die Präzipitate durch ein- bis zweimaliges Waschen mit 1x PBS entfernt und die Zellen anschließend in frischem Vollmedium weiter kultiviert. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde eine separate Kontrollschale mit einem GFP (*Green Fluorescent Protein*)-Konstrukt transfiziert.

3.1.1.1.2 Virusherstellung mit Hilfe der Phoenix^{Eco}-Zellen

Phoenix^{Eco}-Zellen sind sogenannte *Packaging* Zelllinien. Sie werden mit retroviralen Vektoren transfiziert, so dass die RNA des Vektors in infektiöse, Replikationsinkompetente Partikel verpackt wird. Dem retroviralen Vektor fehlen die Gene, die zur Virusherstellung nötig sind. Diese Gene sind stabil in die Phoenix^{Eco}-Zellen integriert, so dass die Zellen zwei Tage nach der Transfektion Virus produzieren und in das Medium abgeben. Durch die Infektion von Zellen mit rekombinanten Retroviren werden die Fremdgene stabil in das Genom der Zellen integriert. Die in dieser Arbeit verwendeten hämatopoetischen Zellen der Maus exprimieren den ekotrophen Rezeptor, welcher die Infektion mit (murinen) ekotrophen Viren ermöglicht. Etwa 16 h nach der Transfektion der Phoenix^{Eco}-Zellen (s.o.) wurden diese mit 5 ml Medium, um den Virus im Überstand anzukonzentrieren, für weitere 16 h kultiviert. Danach wurde der Virusüberstand abgenommen und entweder direkt für eine Infektion eingesetzt, oder nach dem Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80 °C gelagert. Für die Infektion wurde der gefrorene Virusüberstand direkt vor der Infektion bei 37 °C im Wasserbad bzw. Heizblock aufgetaut.

3.1.1.2 *Das MLL-ENL Zellsystem*

Das Zellsystem wurde von Robert Slany (Erlangen, Deutschland) etabliert. Es handelt sich um Maus hämatopoetische Stammzellen. Diese wurden aus dem Femur von C57Bl/6 Mäusen isoliert, mit einem 4-OHT-induzierbaren MLL-ENL Fusionsprotein infiziert und einem Transformations-Assay unterzogen. MLL-ENL ist an einen modifizierten Östrogenrezeptor (ER) gekoppelt, so dass das MLL-ENL-ER Fusionsprotein nur aktiv ist, wenn 4-OHT an den Östrogenrezeptor gebunden vorliegt (Zeisig, 2004 #65; Zeisig, 2004 #65). Die generierten Zellen zeigen unbegrenztes Wachstum, sind jedoch abhängig von verschiedenen Zytokinen (s.u.) und differenzieren unter 4-OHT-Entzug nach ca. 14 Tagen entlang der myeloischen Differenzierungslinie aus.

3.1.1.2.1 Kultivierung der MLL-ENL-ER Zellen

Die Zellen wurden bei 37 °C, 5% CO₂ und 100% relativer Luftfeuchtigkeit im Inkubator kultiviert. Das Vollmedium enthielt 10% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin. Die Kultivierung der Suspensionszellen erfolgte in RPMI + GlutaMax Vollmedium. Diesem mussten 4-OHT und Zytokine, in der unten aufgelisteten Konzentration, *frisch* zugesetzt werden. Die Zytokine wurden aus ihrer Stammlösung (x10.000) zuvor 1:100 in RPMI-Medium verdünnt und jeweils ein Aliquot bei 4 °C gelagert.

	<u>Endkonzentration im Medium</u>
4-OHT	100 nM
mSCF	50 ng/ml
mGM-CSF	5 ng/ml
mIL-3	5 ng/ml
mIL-6	5 ng/ml

3.1.1.2.2 Infektion der MLL-ENL-ER Zellen

Durch die Infektion von Zellen mit rekombinanten Retroviren erreicht man eine stabile Integration der DNA in das Genom der Zellen. Die Infektion der MLL-ENL-ER Zellen erfolgte mithilfe der retroviralen Vektoren MSCV (Maus Stammzell Virus). Im Vergleich zu dem häufig verwendeten Moloney Maus Leukämie Virus (MoMuLV) enthält MSCV eine veränderte 5'-LTR-Sequenz. Diese LTR-Sequenz stammt vom Maus Stammzell Virus PCMV ab. Die 5'-LTR-Sequenz enthält mehrere Mutationen und Deletionen, die die transkriptionelle Aktivität des Vektors in HSC verstärkt und verhindert, dass dieser in den Zellen stillgelegt wird.

Zur Infektion der MLL-ENL-ER Zellen mit dem leeren pMSCV- bzw. dem pMSCV-RasV12-Vektor wurden 200.000 Zellen in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 2 ml Virus und 4 µg/ml Polybren versetzt, kurz gevortext und 2,5 h bei 2500g und 32 °C zentrifugiert (Spinokulation). Anschließend wurde der Überstand abgenommen, die Zellen in 200 µl Medium (mit 4-OHT und Zytokinen) aufgenommen und in ein 96-V-bottom *well* überführt. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C erfolgte eine zweite Spinokulation, woraufhin der Überstand erneut abgenommen wurde und die Zellen in 1 ml Medium mit 4-OHT und Zytokinen aufgenommen und in eine 24-*well* Platte überführt wurden. Weitere 24 h später erfolgte die Selektion mit dem entsprechenden Antibiotikum in der unten angeführten Konzentration.

<u>Antibiotikum</u>	<u>Endkonzentration</u>
Blastizidin (RasV12)	7 µg/ml
Puromyzin (RasV12)	500 ng/ml
Hygromycin (RasV12)	100 µg/ml

3.1.1.2.3 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Zum Einfrieren der Suspensionszellen wurde eine gesamte 6-well Platte (18 ml) geerntet, die Zellen bei 1200 rpm abzentrifugiert und in 1 ml FBS mit 10% DMSO aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen in Kryoröhrchen überführt und bei -80 °C in Styroporboxen für einige Tage aufbewahrt bevor sie in flüssigem Stickstoff gelagert wurden.

Das Auftauen der Zellen erfolgte im 37 °C Wasserbad, woraufhin die Zellen in 10 ml PBS überführt und anschließend zentrifugiert wurden, um verbleibendes DMSO zu entfernen (DMSO löst Differenzierung aus). Die Zellen eines Kryoröhrchens wurden dann in 4 ml Vollmedium mit 20% FBS, Zytokinen und 4-OHT aufgenommen.

3.1.1.2.4 Behandlung der Zellen mit Cytarabin

Cytarabin ist ein Nukleosid Analog und wird in der Zelle zu Cytosin-Arabinosid-Triphosphat verstoffwechselt. Es wird anstelle von Cytosintriphosphat während der Replikation in die DNA eingebaut und. Der genaue Wirkmechanismus, warum es zum Abbruch der Replikationsgabel kommt, ist bisher nicht geklärt, hängt aber wahrscheinlich mit der Hemmung der Primase zusammen. Diese bildet die RNA-Primer am Folgestrang der einzelsträngigen DNA, an die die DNA Polymerase bindet und somit die Okazaki Fragmente produzieren kann (pers. Mitteilung: Frank Grosse, Universität Jena).

Um die Aktivierung der DNA-Schadenssignalkaskade in den Zelllinien zu untersuchen wurden die Zellen für 1, 3 und 6 h mit bis zu 100 µM Cytarabin behandelt.

Für Inkubationen mit Cytarabin über einen Zeitraum von 8 h bis zu 24 h, z.B. für die Induktion der Differenzierung, wurden die Zellen mit 10, 100 bzw. 350 nM Cytarabin behandelt. Nach der Behandlung wurden die Zellen 2x mit PBS-Puffer gewaschen und in Medium ohne Cytarabin kultiviert.

3.1.1.2.5 Lebend-Färbung der Suspensionszellen

Um zu testen, wie die Zellen auf Cytarabin ansprechen, wurden sie nach der Behandlung gezählt. Dafür wurden 100.000 Zellen in eine 24-well Platte ausgesät und für 24 h mit Cytarabin behandelt. Anschließend wurden die Zellen in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt, bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert, der Überstand entfernt und die Zellen in 100 µl Medium bzw. PBS aufgenommen. Von diesen ankonzentrierten Zellen wurden 10 µl entnommen und mit 10 µl Trypanblau vermischt, um die lebenden Zellen von den toten zu unterscheiden. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, dessen Anion an Zellproteine bindet. Das Trypanblau dringt durch defekte Zellmembranen toter Zellen in das Cytosol und färbt diese Zellen tiefblau. Lebende Zellen erscheinen unter dem Mikroskop leuchtend hell. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit der Neubauer Zählkammer nach der Formel:

$$\text{gezählte Zellen in einem Quadranten} \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

Da die Suspensionzellen zuvor 1:1 mit Trypanblau verdünnt wurden, musste die Zellzahl eines Quadranten verdoppelt werden, um auf die Konzentration pro ml zu kommen.

3.1.1.2.6 Methylzellulose Assay zur Bestimmung von CFUs

Methylzellulose ist eine chemische Verbindung die von Cellulose abgeleitet ist. Es ist ein hydrophiles weißes Pulver und löst sich in kaltem (aber nicht in heißem) Wasser auf und bildet dabei eine zähflüssige Lösung oder ein Gel. Mit Hilfe des Methylzellulose Assay ist es möglich hämatopoetische Progenitorzellen *in vitro* zu quantifizieren. In diesem semisoliden Medium haben nur Progenitorzellen und Stammzellen die Fähigkeit zu proliferieren und Kolonien zu bilden. Es ist möglich die Progenitoren von Erythrozyten, Granulozyten und Makrophagen in diesem Assay zu unterscheiden. Die Kolonien von Erythrozyten erscheinen rötlich, während sich die Kolonien von Granulozyten und Makrophagen lediglich in ihrer Größe unterscheiden. Progenitoren von Granulozyten bilden eine homogene Population aus Eosinophilen, Basophilen und Neutrophilen. Die Kolonien sind farblos und wachsen sowohl kompakt als auch diffus. Progenitoren der Makrophagen bilden ebenfalls farblose Kolonien, jedoch sind die einzelnen Zellen größer als Granulozyten.

Für den Methylzellulose-Assay wurden 100.000 Zellen in eine 24-well Platte ausgesät und für 24 h kultiviert bzw. mit 10 nM oder 100 nM Cytarabin behandelt. Anschließend

wurden die Zellen zweimal mit 5 ml PBS-Puffer gewaschen und in 100 µl Medium aufgenommen. Die Zellen wurden mit Hilfe der Neubauer Zählkammer gezählt und 3.000 Zellen in 500 µl Methylzellulose, der zuvor 4-OHT und Zytokine zugegeben wurden, ausgesät. Nach dem Vortexen und kurzem Anzentrifugieren des Methylzellulose/Zell-Gemisches, wurde das Gemisch in eine 24-well Platte, möglichst luftblasenfrei, überführt. Die leeren Vertiefungen wurden mit PBS-Puffer aufgefüllt, um das Austrocknen der Methylzellulose zu verhindern. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 4 Tage bei 37 °C. Die in dieser Zeit gewachsenen Kolonien wurden mit INT gefärbt. Dazu wurde INT (10 mg/ml) 1:10 in PBS-Puffer verdünnt und 50 µl pro Vertiefung hinzu pipettiert. Die Färbung der Kolonien erfolgte über Nacht bei 37 °C.

Zum Auszählen der Zellen in der Methylzellulose wurde das Methylzellulose/Zell-Gemisch mit 1 ml PBS bzw. Medium verdünnt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Das Reaktionsgefäß wurde mit 10 ml PBS aufgefüllt und gevortext. Anschließend wurden die Zellen bei 1200 rpm 5 min zentrifugiert, in 100 µl bis 500 µl PBS aufgenommen und 10 µl dieser Zellsuspension entnommen, mit Trypanblau versetzt und lebende Zellen mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

3.1.1.2.7 Zytospin zum Transferieren der Zellen auf Objektträger

Mit Hilfe des Zytospins ist es möglich Suspensionszellen auf einen Objektträger zu transferieren. Dazu wurde die Zellsuspension auf ein Endvolumen von 250 µl gebracht und die Zellen bei 1200 rpm für 5 min auf die Objektträger zentrifugiert.

3.1.1.2.8 Färbung nach Pappenheim

Die Färbung nach Pappenheim ist eine panoptische Färbung bei der die luftgetrockneten Zellen in einem ersten Schritt mit May-Grünwald Lösung und in einem zweiten Schritt mit Giemsa Lösung gefärbt werden. Diese Lösungen enthalten u.a. Stabilisatoren wie Glycerin, Fixiermittel (Methanol) sowie saure und basische Farbstoffe. Die basischen Farbstoffe (Methylenblau und Brillantkresylblau) bilden in wässriger Lösung aktive Farbstoffanteile mit positiver Ladung und färben Zellbestandteile, die negative Ladung tragen, bläulich an. Die sauren Farbstoffe (Eosin und Säurefuchsin) zerfallen in wässriger Lösung in aktive Farbstoffanteile mit negativer Ladung und färben Eiweißstrukturen positiver Ladung. Neutrophile Substanzen lassen sich sowohl mit basischen als auch mit sauren Farbstoffen anfärben. Bei der Pappenheimfärbung handelt es sich

um eine panoptische/panchromatische Färbung, da basophile, neutrophile und eosinophile Strukturen dargestellt werden. (Quelle: <http://de.wikipedia.org/wiki/Pappenheim-Färbung>).

Eine Million Zellen wurden in 3 ml Medium (6-well Platte) ausgesät und entweder unbehandelt oder für 24 h mit 350 nM Cytarabin kultiviert. Im Anschluss daran wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und für weitere 48 h in Medium ohne Cytarabin kultiviert. Für die Färbung wurden von diesen Ansätzen 50.000 Zellen in 250 µl PBS mit Hilfe des Zytospins auf einen Objektträger transferiert. Nach der Zentrifugation wurden die Objektträger 3 min luftgetrocknet, anschließend 5 min in May-Grünwald Lösung gelegt worauf sie für 1,5 min in PBS gewaschen wurden. Für den letzten Färbeschritt wurden die Objektträger 20 min in Giemsa (1:20 Verdünnung in PBS) gefärbt. Zuletzt wurden die Objektträger mit deionisiertem Wasser abgespült und erneut luftgetrocknet. Das Mikroskopieren der Zellen erfolgte ohne Eindeckeln in Öl. Zum konservieren der gefärbten Zellen über mehrere Jahre, ist es notwendig die Zellen mit Xylan einzudeckeln.

3.1.1.2.9 β-Galaktosidase Färbung

Das Enzym β-Galaktosidase ist eine Glykosidase, die Bindungen von β-Galactopyranosiden hydrolysiert und zu Monosacchariden abbaut. Zellen, die dieses Enzym exprimieren sind damit in der Lage das Substrat X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid) zu Galactose und einen blauen, wasserunlöslichen Indigo-Farbstoff zu hydrolysieren, was zu einer Blaufärbung der Zellen führt.

1×10^6 Zellen wurden in 3 ml Medium (6-well Platte) ausgesät und unbehandelt bzw. für 24 h mit 350 nM Cytarabin kultiviert. Anschließend wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und für weitere 48 h in Medium ohne Cytarabin kultiviert. Daraufhin wurden die Zellen in ein Reaktionsgefäß überführt, zentrifugiert und in 1 ml Glutardialdehyd [0,5 M] in PBS pH 7,2 für 10 min bei RT fixiert. Danach wurden die Zellen mit 5 ml $MgCl_2$ [1 mM] in PBS pH 7,2 gewaschen und in 200 µl Färbelösung aufgenommen. Die Färbelösung bestand aus PBS-Puffer pH 6,0, dem folgenden Komponenten hinzu gegeben wurden:

<u>Substrat</u>	<u>Endkonzentration</u>
x-Gal	1 mg/ml
K_3Fe_6	0,12 M
K_4Fe_6	0,12 M
$MgCl_2$	1 mM

Die Inkubation der Zellen in dieser Lösung erfolgte in einer 96-well Platte bei 37 °C für 12 h bis 14 h. Die Platte wurde mit Parafilm abgedichtet. Im Anschluss daran wurden 100 µl der Zellsuspension (500.000 Zellen) mit 150 µl PBS versetzt und mittels Zytospin auf Objektträger zentrifugiert. Das Eindeckeln der Zellen erfolgte mit Mowiol-488.

3.1.1.2.10 Immunfluoreszenz

Diese Methode ermöglicht einen direkten Nachweis von Proteinen in einer Zelle, ohne dass diese zuvor lysiert werden muss. Dadurch ist es z.B. möglich, Aussagen über die Lokalisation eines Proteins zu treffen. In dieser Arbeit wurde die indirekte Immunfluoreszenz-Färbung angewandt. Dabei wurden im ersten Schritt die Zellen mit einem spezifischen Antikörper (Primärantikörper) inkubiert. In einem zweiten Schritt wurde ein Antikörper aufgetragen, der sich gegen den ersten Antikörper richtet (Sekundärantikörper). Dieser war mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt (z.B. Alexa Fluor 488).

Für die Immunfluoreszenz wurden je 500.000 Zellen in 24-well Platten ausgesät und unbehandelt oder mit 100 µM Cytarabin für 1 h kultiviert. Daraufhin wurden die Zellen gezählt und 100.000 Zellen mittels Zytospin für 7 min bei 1200 rpm auf einen Objektträger transferiert. Anschließend wurden die Zellen mit 3,7%igem pFA fixiert. Darauf folgend wurden die Zellen zweimal mit Glyzin-Puffer und zweimal mit NP-40-Puffer gewaschen. Um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu verhindern wurden die Zellen für 45 min in einer Blockierlösung (PBS/0,1% NP-40/5% FCS) gehalten. In dieser Lösung wurde auch der Primärantikörper entsprechend verdünnt und die Zellen für 45 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit dieser Lösung dreimal gewaschen und der entsprechende Sekundärantikörper (Alexa 488 oder 467) zusammen mit HOECHST-Farbstoff, welcher die DNA färbt, hinzupipettiert. Die Inkubation erfolgte für 45 min bei RT. Ab diesem Schritt mussten die Zellen vor Licht geschützt werden, um das Ausbleichen der Farbstoffe zu verhindern. Nach der Inkubation wurden die Zellen dreimal mit NP-40-Waschpuffer gewaschen und anschließend nacheinander mit PBS, Wasser und Isopropanol gespült. Die Eindeckelung erfolgte in Mowiol, welches mit DABCO versetzt war, um die Fluoreszenzfarbstoffe zu stabilisieren. Die Messung erfolgte noch am gleichen Tag mit dem BD Pathway 855 Bioimager.

3.2 Durchflusszytometrie

Die Fluoreszenz-aktivierte Durchflusszytometrie beruht auf der Erfassung von Reflexions- und Streulichtphänomenen. Diese entstehen, wenn das Licht einer definierten Wellenlänge auf Fluoreszenzfarbstoffe trifft und sie zur Emission elektromagnetischer Wellen anregt. Das resultierende Fluoreszenzspektrum kann von einem FACS-Gerät detektiert werden. Die Fluoreszenzfarbstoffe sind an Antikörper gekoppelt, die z.B. gegen Oberflächenmoleküle oder intrazelluläre Proteine gerichtet sind. Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe sind Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE). Durch Messung der Emissionsintensität bei einer definierten Wellenlänge können quantitative Aussagen über die Antigene getroffen werden.

3.2.1 FACS (*Fluorescence-activated cell sorting*) Analyse von Oberflächenmarkern

CD (*Cluster of Differentiation*) - Moleküle werden auf der Oberfläche von Leukozyten exprimiert. Es handelt sich dabei z.B. um Glykoproteine oder Rezeptoren, die verwendet werden, um Knochenmarkszellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie zu charakterisieren oder zu sortieren. In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 1×10^6 Zellen in 100 μ l PBS mit einem Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper und 0,5 μ l eines Fc-Blockers (α -Maus CD16/CD32; 0,5 mg/ml) versetzt. Der Fc-Blocker dient dem Sättigen der Fc-Rezeptoren auf der Oberfläche von Leukozyten. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 30 min bei 4 °C. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation (2 min, 500 x g, 4 °C) pelletiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet mit 1 ml PBS-Puffer gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation (2 min, 500 x g, 4 °C) wurde das Zellpellet in 500 μ L PBS-Puffer aufgenommen und die Probe in ein FACS-Röhrchen (BD Biosciences) überführt. 50.000 Zellen pro Probe wurden im FACS-Gerät gemessen. Dabei wurden der FITC-markierte Antikörper im FL1-H-Kanal und der PE-markierte Antikörper im FL2-H-Kanal detektiert. Des Weiteren konnten die Zellen im Forward/Sideward-Scatter, welcher Aussagen über die Größe und Granularität der Zellen liefert, analysiert werden.

Die Messung und Auswertung erfolgte mit der Software CellQuest Pro (BD Biosciences) nach Anweisungen des Herstellers.

Die Antikörper wurden wie folgt eingesetzt:

PE-markierte AK	Konzentration [mg/ml]	Einsatz [µg] pro 1x10⁶ Zellen	Einsatz [µl] pro 1x10⁶ Zellen
c-kit (CD117)	0,2	0,2	1
Mac1 (CD11b)	0,2	1	5
Sca1	0,1	1	10
Gr1 (Ly6G)	0,2	1	5

FITC-markierte AK	Konzentration [mg/ml]	Einsatz [µg] pro 1x10⁶ Zellen	Einsatz [µl] pro 1x10⁶ Zellen
Gr1 (Ly6G)	0,1	1	10
Mac1 (CD11b)	0,5	1	2
CD45	0,1	1	10
c-kit (CD117)	0,5	2,5	5

Alexa488-markierte AK	Konzentration [mg/ml]	Einsatz [µg] pro 1x10⁶ Zellen	Einsatz [µl] pro 1x10⁶ Zellen
F4/80	0,05	0,5	10

3.2.1.1 Magnetische Separation von Zellen

Für die Separation der c-kit- bzw. Mac1-positiven Populationen innerhalb der Gesamtzellsuspension wurde die magnetische Zellsortierung (*Magnetic-activated cell sorting*, MACS), nach den Angaben des Herstellers, angewendet. Dazu wurden die Zellen mit FITC-gekoppeltem Antikörper markiert und an Anti-FITC Microbeads (Miltenyi Biotec) gebunden. Die Auftrennung der Zellen erfolgte über eine MS-Säule (Miltenyi Biotec) mit Hilfe eines mini-MACS Magneten (Miltenyi Biotec).

3.2.2 Intrazelluläre phospho-Chk1 FACS Analyse

Für die Detektion von phosphoryliertem Chk1 wurde ein Antikörper der Firma *Cell Signaling* verwendet und die Methode nach Herstellerangaben durchgeführt. 1x10⁶ Zellen wurden in 600 µl PBS aufgenommen und 10% Formaldehyd bis zu einer Endkonzentration von 4% dazu pipettiert. Die Zellen wurden für 10 min bei 37 °C fixiert und anschließend auf Eis gestellt. Die Permeabilisierung erfolgte durch Zugabe von eiskal-

tem Methanol bis zu einer Endkonzentration von 90% und einer anschließenden Inkubation von 30 min auf Eis. Die Färbung erfolgte, nach dem Waschen der Zellen mit 0,5% BSA in PBS-Puffer, durch Zugabe des Antikörpers und Inkubation für 30-60 min bei RT. Nachfolgend wurden die Zellen gewaschen und mit Alexa488-markierten sekundären Antikörpern versetzt. Nach 30-minütiger Inkubation wurden die Zellen gewaschen, in 500 µl PBS-Puffer aufgenommen und mit Hilfe der Durchflusszytometrie gemessen.

Die verwendeten Antikörper wurden wie folgt eingesetzt:

	Konzentration [mg/ml]	Einsatz [µg] pro 1x10⁶ Zellen	Einsatz [µl] pro 1x10⁶ Zellen
phospho-Chk1	keine Angaben	keine Angaben	10
Alexa488-markierter anti-Kaninchen AK	2	20	1

3.2.2.1 Zweidimensionale phospho-Chk1/Mac1 FACS Analyse

Im Gegensatz zur Detektion von Oberflächenproteinen mittels FACS müssen bei der Detektion von intrazellulären Proteinen die Zellen fixiert und die Membranen permeabilisiert werden. Dies zerstört jedoch die Struktur der Membran. Daher wird bei Doppelmarkierung eines Oberflächenproteins mit einem intrazellulären Protein zuerst die Markierung des Oberflächenproteins durchgeführt. Nach der Markierung von Mac1, erfolgte die phospho-Chk1 Färbung wie bereits unter Abschnitt 3.2.2 beschrieben, allerdings wurden die Zellen mit 50% Methanol, anstatt 90%, permeabilisiert.

3.2.3 Zweidimensionale Propidiumjodid-BrdU FACS Analyse

BrdU wird während der Replikation in die DNA eingebaut und kann somit zur genauen Quantifizierung der Zellen in dieser Phase verwendet werden. Dazu wurden die Zellen 1 h vor der Fixierung mit 10 µM BrdU versetzt. Die durchflusszytometrische Analyse der Zellen in der Replikationsphase erfolgte mit Hilfe des *BrdU Flow Kits* (BD Biosciences), das nach den Anweisungen des Herstellers angewendet wurde. Anstelle des Fluoreszenzfarbstoffes 7-AAD wurde die DNA durch Zugabe von 15 µl Propidiumjodid gefärbt.

3.2.4 Intrazelluläre aktive-Caspase 3 FACS Analyse

Für die durchflusszytometrische Analyse der aktivierten Caspase 3 in den Zellen wurde das *FITC-conjugated Monoclonal Active Caspase 3 Antibody Apoptosis Kit* (BD Biosciences) nach Anweisung des Herstellers verwendet. Für die Doppelfärbung mit Mac1 erfolgte zuerst die Markierung des Oberflächenproteins.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Transformation von kompetenten Bakterien mit Plasmid-DNA

Die zu transformierende Plasmid-DNA (1-2 µg) wurde mit 100 µl kompetenten *Escherichia coli*-Bakterien (*E. coli*) des Stammes DH5α gemischt. Nach einer Inkubation auf Eis für 20 min wurde die DNA mittels Hitzeschock (90 s, 42 °C) in die Zellen eingebracht und der Ansatz für 2 min auf Eis inkubiert. Danach wurde dem Ansatz 1 ml LB-Medium hinzugegeben und für 45-90 min bei 37 °C geschüttelt. Sofern die Transformation der reinen Vervielfältigung des Plasmides diente, wurde der gesamte Ansatz in einen 2-Liter-Kolben mit 200 ml LBA-Medium für eine anschließende Plasmidpräparation überführt. Bei der Transformation eines Ligationsansatzes wurden die Reaktionsgefäße kurz zentrifugiert und ca. 90% des Überstandes abgenommen. Das Pellet wurde in dem verbliebenen LB-Medium resuspendiert. Die somit ankonzentrierten *E. coli*-Bakterien wurden auf einer LBA-Agarplatte mit Drigalskispatel ausplattiert. Anschließend erfolgte die Vermehrung der *E. coli*-Bakterien durch Inkubation über Nacht (12-16 h) bei 37 °C. Bakterienkolonien, die am nächsten Tag auf der LBA-Agarplatte wuchsen, wurden in ein Reagenzglas mit 3 ml LBA-Medium überführt und für eine weitere Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert.

3.3.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Nach Vermehrung der transformierten Bakterien in einer 200 ml Flüssigkultur wurde eine Plasmid-Präparation (Maxi-Präparation) gemäß den Angaben des Herstellers (JETSTAR 2.0 *Plasmid Purification Maxi Kit*, Genomed, Löhne) durchgeführt. Das am Ende erhaltene DNA Pellet wurde in sterilem Wasser gelöst, auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt und bei -20 °C gelagert. Für die Isolierung der Plasmid-DNA aus

einer 3-ml-Flüssigkultur (Mini-Präparation) wurden 1,5 ml dieser Kultur in ein Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 2.500 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 110 µl STET-Puffer resuspendiert. Die Probe wurde anschließend für 5 min bei RT und für 1 min bei 95 °C inkubiert. Danach wurde sie für 10 min bei 18.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen. Zu dem Überstand wurden 110 µl Isopropanol gegeben und der Ansatz gut gemischt. Nach der Zentrifugation der Probe für 5 min bei 18.000 x g und 4 °C wurde das erhaltene Pellet mit 1 ml 70% (v/v) Ethanol versetzt und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde getrocknet und die Plasmid-DNA in 30 µl sterilem Wasser gelöst.

3.3.3 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Für eine analytische Restriktion wurden 3 µl einer Mini-Präparation bzw. 0,5-1 µg einer Maxi-Präparation eingesetzt. Zur spezifischen Spaltung von DNA wurden Restriktionsendonukleasen der Klasse II verwendet. Die Restriktionsenzyme wurden in dem vom Hersteller angegebenen Reaktionspuffer verwendet. Manche Enzyme benötigen für ihre volle Aktivität den Zusatz von BSA (Bovines Serum Albumin). Die Inkubation der Reaktion erfolgte bei der für das Enzym optimalen Temperatur (meist 37 °C) für 1-3 h oder über Nacht bei RT.

Ein präparativer Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Plasmid-DNA	3 µg
10x Restriktionspuffer	5 µl
Restriktionsenzym	1,5 µl
ddH ₂ O	ad 50 µl

Zur Analyse und Trennung von DNA-Fragmenten wurde eine Agarosegelelektrophorese mit Ethidiumbromid durchgeführt (Sharp et al., 1973). Bei der Gelelektrophorese werden die negativ geladenen DNA-Fragmente in einem elektrischen Feld aufgrund ihrer Mobilität, die proportional zum Ladungs-Massen-Verhältnis der DNA-Fragmente ist, separiert. Je nach erwarteter Größe der DNA-Fragmente wurde eine Lösung aus 1-2% (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer aufgekocht. Nach dem Abkühlen der Lösung auf ca. 50 °C wurde sie mit 20 µl/l einer Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) versetzt. Die Auftrennung erfolgte bei Anlegen einer Spannung von 120 V für 30-60 min. Dass in die

DNA interkalierende Ethidiumbromid fluoresziert bei Anregung mit UV-Licht der Wellenlänge von 254 nm (Kemp et al., 1989).

3.3.3.1 Dephosphorylierung der geschnittenen Plasmid-DNA

Wurde die Plasmid-DNA nur mit einem Enzym geschnitten war es ggf. notwendig die geschnittenen DNA-Enden zu dephosphorylieren, um eine Religation des Vektors zu verhindern. Dazu wurde zu der geschnittenen Plasmid-DNA 1 µl alkaline Phosphatase (Fermentas) und 5 µl Phosphatasepuffer zugegeben und der Ansatz für 10 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 50 µl ddH₂O dazu pipettiert, woraufhin eine Hitzeinaktivierung für 10 min bei 65 °C erfolgte. Die Plasmid-DNA wurde mit Ethanol gefällt. Dazu musste dem Ansatz 10 µl 3 M Natriumacetat und 250 µl absoluter eiskalter Ethanol hinzugefügt werden. Der Ansatz wurde vermischt und für 20 sek zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde anschließend in 10-20 µl ddH₂O aufgenommen und mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese aufgetrennt.

3.3.4 Extraktion von Nukleinsäuren aus Agarosegelen

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel wurde QIAEX® II (Qiagen) verwendet. Das gewünschte DNA-Fragment wurde mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und gewogen. Die Extraktion der DNA aus dem Gelstück erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

3.3.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Verknüpfung von überhängenden komplementären oder glatten doppelsträngigen DNA-Fragmenten wurde die T4-DNA-Ligase (NEB) verwendet. Für die Ligation sollte das molare Verhältnis von Vektor und *insert* etwa 1:5 betragen. Das MW doppelsträngiger DNA beträgt 660 Da. Die Anzahl der pmol eines DNA-Fragmentes wird mit folgender Formel berechnet:

$$\text{pmol} = \frac{\mu\text{g DNA} \times 10^6}{\text{Anzahl der Nukleotide} \times 660}$$

Ein Standard-Ligationsansatz mit einem Endvolumen von 25 µl setzte sich wie folgt zusammen:

Vektor	100 ng
<i>Insert</i>	5-facher molarer Überschuss
Ligasepuffer	2,5 µl
T4-DNA-Ligase	1µl
ddH ₂ O	ad 25 µl

Die Ligation erfolgte bei RT für mindestens 3-4 h oder über Nacht. Die Ligase wurde durch Inkubation für 10 min bei 65 °C inaktiviert.

3.4 Expressionsanalysen

3.4.1 Isolierung von gesamt RNA

Für die Isolierung der gesamt RNA wurden die Zellen in 1 ml Trizol™ Reagenz resuspendiert und für 5 min bei RT inkubiert. An dieser Stelle konnten die Proben bei -80 °C über Monate gelagert werden und wurden bei Bedarf bei 37 °C aufgetaut. Zur weiteren Isolierung der RNA erfolgte die Zugabe von 200 µl kaltem Chloroform. Durch Vortexen von 15 sek wurden die Proben gemischt und anschließend für 5 min bei RT inkubiert. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation für 10 min bei 12000 x g und 4 °C. Die wässrige RNA-haltige Phase wurde vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 500 µl Isopropanol versetzt und für 10 min bei RT inkubiert. Die RNA wurde durch zentrifugieren für 10 min bei 12000 x g und 4 °C gefällt. Anschließend wurde das RNA-Pellet mit 500 µl 75%igem Ethanol (in DEPC-H₂O) gewaschen. Nach dem Abnehmen des Überstandes und Trocknen des Pellets bei RT wurde die RNA in 25 µl DEPC-H₂O gelöst. Der RNA-Gehalt einer Lösung wurde mit einem NanoDrop Spektrophotometer bestimmt. Hierzu wurde 1 µl der Lösung gemessen. Im Photometer lässt sich weiterhin auch der Reinheitsgrad der Nukleinsäure-Probe bestimmen. Hierzu wurde die Absorption bei 280 nm, dem Absorptionsmaximum von Proteinen, gemessen. Durch das Verhältnis von A₂₆₀ zu A₂₈₀ kann der Reinheitsgrad abgeschätzt werden. Saubere DNA-Lösungen weisen hier ein Verhältnis von 1,8 auf, RNA-Lösungen

ein Verhältnis von 2,0. Durch Kontamination mit Proteinen werden diese Werte entsprechend kleiner.

3.4.2 Reverse Transkription zur cDNA Synthese

Die Gewinnung von cDNA aus RNA-Proben erfolgte durch *Reverse Transkription* mit Hilfe der *M-MLV-RT* (Invitrogen). Für die Reaktion wurden zwischen 0,8 und 2 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Diese wurde mit DEPC-H₂O auf 10 µl Gesamtvolumen gebracht, der Ansatz für 1 min bei 65 °C inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Zu der RNA wurden 40 µl eines Mixes zugegeben. Dieser bestand aus:

5 x <i>First Strand</i> buffer	10 µl
0,1 M DTT	5 µl
2,5 M dNTP-Mix	5 µl
<i>random primer</i>	2 µl
RNAsin (RNase-Inhibitor)	0,2 µl
M-MLV RT [200 U]	1 µl
H ₂ O	16,8 µl

Der Ansatz wurde für 10 min bei 25 °C inkubiert. Die cDNA-Synthese erfolgte für 50 min bei 37 °C und folgenden 15 min bei 70 °C. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

3.4.3 RT-PCR zur Expressionsanalyse von MLL-ENL-ER

Zur semiquantitativen Analyse von RNA wurde diese vor der Amplifikation zunächst wie unter 3.4.2 beschrieben in cDNA umgeschrieben. Die spezifische Amplifikation der cDNA erfolgte durch konventionelle PCR-Reaktionen. Dafür wurden pro Ansatz standardmäßig 2 µl cDNA eingesetzt. Die Temperatur- und Reaktionsbedingungen wurden empirisch ermittelt und an die Anforderungen der entsprechenden Oligonukleotide angepasst. Dabei war darauf zu achten, dass die Menge des Endproduktes im linearen Bereich lag, um eine semiquantitative Analyse der Genexpression zu gewährleisten. Die PCR-Reaktionen erfolgten in einem Primus 96 Plus Thermal Cycler. Das Amplifikationsprodukt der MLL-ENL-ER PCR ist ca. 500 bp groß.

<u>Reaktionsansatz:</u>		<u>PCR-Programm:</u>	
cDNA	2 µl	95 °C	5 min
10x <i>Red taq</i> Puffer	3 µl	95 °C	30 sek
10 pM <i>forward</i> Primer	1,2 µl	65 °C	30 sek
10 pM <i>reverse</i> Primer	1,2 µl	72 °C	30 sek
10 mM dNTPs	0,6 µl	72 °C	10 min
<i>Red taq</i> Polymerase (Sigma)	1,5 µl	8 °C	∞
H ₂ O	ad 30 µl		

} 33 Zyklen

3.4.4 Quantitative Echtzeit-PCR: *Real time* PCR

Sämtliche hierfür notwendigen Reagenzien wurden mit dem ImmoMix™ Kit (Bioline) bezogen. Die Durchführung erfolgte mit dem *Mx3000* (Stratagene). Für die *Real Time* PCR (qRT-PCR) wurden 2 µl cDNA eingesetzt. Jede Probe wurde grundsätzlich in Triplikaten gemessen.

<u>Reaktionsansatz</u>		<u>PCR-Programm:</u>	
cDNA	2 µl	95 °C	10 min
10 µM <i>forward</i> Primer	0,4 µl	95 °C	15 sek
10 µM <i>reverse</i> Primer	0,4 µl	60 °C	1 min
<i>Sybr-Green</i>	0,4 µl	40 Zyklen	
ImmoMix™	10 µl		
H ₂ O	ad 20 µl		

Die differentielle Expression eines Genes wurde mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$$\text{Aktivierung/Repression} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Probe}} - \Delta Ct_{\text{Referenz}} \text{ mit } \Delta Ct = Ct_{\text{Gen}} - Ct_{\text{Standard}}$$

Berechnung der Standardabweichung der $\Delta\Delta Ct$ -Werte:

$$s = \sqrt{s_1^2 + s_2^2} \quad s1: \text{Standardabweichung Gen}$$

$$s2: \text{Standardabweichung Standard (z.B. rps16)}$$

Für die Funktion $2^{-\Delta\Delta Ct}$ wurde anschließend der Fehlerbereich $2^{-\Delta\Delta Ct \pm s}$ berechnet. Der Fehler wurde dann folgendermaßen angegeben:

$$\text{Fehler} = (2^{-\Delta\Delta Ct + s}) - (2^{-\Delta\Delta Ct}).$$

Der Test auf Signifikanz wurde mit dem Zweistichproben t-Test mit Welch-Korrektur berechnet.

3.5 Biochemische Methoden

3.5.1 Gesamtzelllysate

Gesamtzelllysate (Proteinlysate) wurden durch Lyse der Zellen in TNN-Puffer oder Ripa-Puffer gewonnen. Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis oder bei 4 °C. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch Zentrifugieren für 5 min bei 3000 rpm wurden die Zellen pelletiert. Bei Bedarf können die Zellpellets an dieser Stelle nach dem Schockgefrieren in Flüssig-Stickstoff für längere Zeit bei -80 °C gelagert werden. Im Anschluss wurden die Zellen im 10-fachen ihres Volumens in TNN-Puffer bzw. Ripa-Puffer aufgenommen und durch Auf- und Abpipettieren gut resuspendiert. Nach einer Inkubation von 20 min auf Eis und folgendem kurzen Vortexen der Proben, wurden die lysierten Zellen für 10 min bei 14000 rpm sedimentiert. Der Überstand (Ganzzelllysat) wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und direkt weiterverwendet.

3.5.2 Ras Aktivierungs-Assay

Die Detektion von aktivem Ras erfolgte mit dem *Ras Activation Assay Kit* (Millipore) nach den Anweisungen des Herstellers. Für die Zelllyse wurden 6 Mio Zellen einge-

setzt und ca. 1500 µg Lysat mit einem GST-Raf Fusionsprotein, gebunden an Glutathionagarose-Kügelchen, inkubiert. Der Nachweis des präzipitierten aktiven Ras-Proteins erfolgte durch Western-Blot, indem die Membran mit einem für Ras spezifischen Antikörper inkubiert wurde.

3.5.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Lysaten aus Zellen erfolgte mit der von Bradford beschriebenen Methode. Anhand einer BSA-Referenzgeraden konnte der Proteingehalt der untersuchten Proteinlösung abgelesen werden. Zur Erstellung der BSA-Referenzgeraden wurden je 1, 2, 4, 6 und 8 µl einer 1 mg/ml konzentrierten BSA-Lösung mit 1 ml Bradford-Reagenz gemischt. Parallel wurde in der gleichen Weise mit 2 µl der zu messenden Proteinlösung verfahren. Nach einer Inkubationszeit von mind. 10 min bei RT wurde die Absorption der Proben bei einer Wellenlänge von 595 nm im Vergleich zu einer Leerprobe photometrisch bestimmt.

3.5.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteinlösungen wurden in vertikalen eindimensionalen Polyacrylamidgelen unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli (1970) aufgetrennt. Die Proben passierten zunächst ein Sammelgel mit einer großen Polyacrylamid-Porenweite von 5%. Beim anschließenden Durchlaufen des kleinporigeren Trenngels (7 - 15%) wurden die Proteine entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Für eine gute Auftrennung im großen Molekulargewichtsbereich wurden niedrigprozentige Gele verwendet. Eine gute Auftrennung von Proteinen mit niedrigem Molekulargewicht, wurde durch die Verwendung von höher prozentigen Gelen erreicht.

Beispiel für die Zusammensetzung eines Sammel- und Trenngels:

<u>5% Sammelgel</u>		<u>10% Trenngel</u>	
Bis-Acrylamid	1,6 ml	Bis-Acrylamid	5,0 ml
0,5 M Tris pH 6,8	1,4 ml	1,5 M Tris pH 8,8	3,7 ml
20% SDS	50 µl	20% SDS	75 µl
10% APS	50 µl	10% APS	100 µl
Temed	10 µl	Temed	10 µl
ddH ₂ O	6,9 ml	ddH ₂ O	6,1 ml

Vor dem Auftragen auf das Gel, wurden die Proteinproben in 3x SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 95 °C inkubiert. Die Detektion der aufgetrennten Proteine erfolgte durch Western-Blot. Die Größe der Proteine konnte anhand eines mit aufgetrennten Größenstandards abgeschätzt werden.

3.5.5 Western-Blot

Beim Western-Blot wurden die verschiedenen Komponenten einer Proteinlösung zunächst über eine SDS-PAGE (3.5.4.) elektrophoretisch getrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Nachweis der transferierten Proteine erfolgte mit spezifischen Erstantikörpern und Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Zweitantikörpern.

Elektrophoretischer Transfer auf eine PVDF-Membran

PVDF-Membranen besitzen eine sehr hohe Bindekapazität für Proteine und eignen sich besonders gut für einen Nachweis durch Chemilumineszenz. Vor Gebrauch wurde die PVDF-Membran zunächst für mindestens 1 min in Methanol equilibriert. Der elektrophoretische Transfer auf die Membran erfolgte wahlweise im Nass- oder *Semi-Dry*-Verfahren. Dabei war darauf zu achten, dass sich zwischen den einzelnen Komponenten des Blots keine Luftblasen bildeten.

Nass (Tank)-Blot

Zunächst wurde eine PVDF-Membran in der Größe des Gels in Methanol inkubiert und anschließend in Blotting-Puffer gewaschen. Ebenso wurde Whatman-Papier auf die Größe des Gels zugeschnitten und in Blotting-Puffer kurz inkubiert. Der Aufbau des Blots erfolgte von der Anode zur Kathode in einem Plastikrahmen in folgender Reihenfolge: 1 Schwammtuch, 1 Whatman-Papier, PVDF-Membran, Gel, 1 Whatman-Papier, 1 Schwammtuch. Der Plastikrahmen wurde zwischen Anode und Kathode fixiert und zusammen mit einem Eisakku (zur Kühlung) in eine vollständig mit Blotting-Puffer gefüllte Blot-Kammer getaucht. Der Transfer erfolgte für 90 min bei 250 mA.

Semi-Dry-Blot

Beim diesem Blotting-Verfahren wurden zunächst je drei Whatman-Papiere in der Größe des Gels in Anodenpuffer I, Anodenpuffer II oder Kathodenpuffer inkubiert. Die PVDF-Membran wurde in Methanol equilibriert und anschließend in Anodenpuffer I gewaschen. Der Aufbau des Blots erfolgte von der Anode zur Kathode in folgender Reihenfolge: 3 Whatman-Papiere in Anodenpuffer II, 3 Whatman-Papiere in Anoden-

puffer I, PVDF-Membran in Anodenpuffer I, Gel, 3 Whatman-Papiere in Kathodenpuffer. Der Transfer erfolgte für 45 min bei 25 V.

Ponceau S-Färbung

Zur Kontrolle des Proteintransfers wurde die PVDF-Membran nach dem Blotten mit Ponceau S gefärbt. Die Anfärbung mit Ponceau S ist nicht permanent und daher mit dem eigentlichen Nachweisverfahren kompatibel. Für die Färbung wurde die Membran direkt nach dem Transfer kurz in Ponceau S-Lösung inkubiert und anschließend mit entsalztem Wasser gewaschen. Nach der Transferkontrolle wurde die Membran durch weiteres Waschen vollständig entfärbt.

Nachweisreaktion

Die Detektion der transferierten Proteine erfolgte mit Chemilumineszenz-kombinierten immunologischen Nachweisreaktionen. Um unspezifische Bindungen der Nachweisreagenzien an die Membran zu verhindern, wurde diese zunächst in 5%igem Milchpulver (in TBST) für mindestens 30 min bei RT und unter leichtem Schütteln abgesättigt. Die Inkubation mit Erstantikörper erfolgte ebenfalls in 5%igem Milchpulver und über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln. Sofern nicht anders angegeben, wurde der Erstantikörper 1:1000 verdünnt eingesetzt. Anschließend wurde ungebundener Erstantikörper von der Membran durch dreimaliges Waschen in TBST (3x 10 min) entfernt. Als Zweitantikörper wurde standardmäßig ein Meerrettich-Peroxidase gekoppelter anti-Maus bzw. anti-Kaninchen Antikörper 1:3000 in TBST verwendet. Nach einer Inkubation von 1 h bei RT wurde die Membran erneut 4x gewaschen, 1x 10 min in 5%igem Milchpulver und 3x 10 min in TBST. Zum Entwickeln wurde die Membran für mindestens 5 min in frisch angesetzter Entwicklerlösung (*Immobilon Western Detection Reagents*; Millipore) inkubiert und im Anschluss in Haushaltsfolie eingeschlagen. Die Dokumentation der Nachweisreaktion erfolgte durch Exposition eines ECL-Films (Kodak).

Strippen der Membran

Zum Entfernen des gebundenen Primärantikörpers von der PVDF-Membran für eine Detektion eines anderen Proteins wurde die Membran, sofern sie trocken war, zunächst kurz in Methanol inkubiert. Anschließend wurde sie für 35 min bei 60 °C in *Stripping*-Puffer geschüttelt. Dann wurde die Membran in ddH₂O gespült, gefolgt von einer dreimaligen Inkubation für je 10 min in TBST. Nach dem Waschen wurde die Membran zunächst in 5%igem Milchpulver (in TBST) für mindestens 30 min bei RT und unter leichtem Schütteln abgesättigt woraufhin die Inkubation mit Erstantikörper folgte.

4 Ergebnisse

Mutiertes *RAS* kommt in 30 % aller akuten myelischen Leukämien vor. Die *CALGB 8525* Studie hat gezeigt, dass ein Zusammenhang zwischen *RAS*-Status, eingesetzter Cytarabin Dosis und Rückfallrisiko besteht. Patienten mit einer *RAS* Mutation entwickeln, unabhängig von ihrem zytogenetischen Hintergrund, signifikant weniger Rezidive als Patienten mit wildtyp *RAS*, wenn sie mit Hochdosis-Chemotherapie behandelt werden (siehe Abschnitt 1.3).

Um der Frage nachzugehen, ob der *RAS*-Status auch *in vitro* eine Auswirkung auf die Cytarabin-Behandlung von hämatopoetischen Zellen zeigt, wurde ein Zellsystem mit dem onkogenen Fusionsprotein MLL-ENL verwendet, das Robert Slany (Universität Erlangen, Deutschland) etablierte. Dazu wurden aus dem Knochenmark von C57Bl/6 Mäusen hämatopoetische Stammzellen (HSC) isoliert, die zuvor durch Injektion mit 5-Fluorouracil angereichert wurden. Zur Immortalisierung wurden die Zellen mit einem Vektor, der für ein MLL-ENL Fusionsprotein kodiert, infiziert und einem Transformationsassay unterzogen (**Abb. 7**). Die primären, immortalen Zellen teilten sich unbegrenzt, waren jedoch abhängig von den Interleukinen IL-3 und IL-6, sowie von den Wachstumsfaktoren GM-CSF und SCF. MLL-ENL ist in diesem System an einen modifizierten Östrogenrezeptor (ER) gekoppelt, so dass das Protein nur unter Zugabe von 4-OHT (4-Hydroxytamoxifen) aktiv ist. Nach 14 Tagen Kultivierung in Abwesenheit von 4-OHT differenzierten die Zellen vollständig zu Monozyten/Makrophagen und Granulozyten aus, was zeigte, dass es sich bei den immortalen Zellen um myeloische Progenitoren handelt (Zeisig, 2004 #65). Die Verwendung dieses Zellsystems erfolgte aus drei Gründen:

1. MLL-ENL kommt ausschließlich bei Leukämien vor.
2. Infizierte Knochenmarks-Zellen zeigen einen myeloischen Phänotyp
3. MLL-ENL allein wirkt schon immortalisierend, so dass die Zellen kein zweites Onkogen benötigen, um einen leukämischen Phänotyp zu entwickeln.

4.1 Generierung *RAS*^{V12}-infizierter MLL-ENL-ER Zellen

Um MLL-ENL-ER Zellen herzustellen, die mutiertes *RAS* stabil im Genom integriert haben, wurden die Zellen mit retroviralen Vektoren (3.1.1.2.2) infiziert. Dies erfolgte

entweder mit leerem pMSCV-Vektor (Kontroll-Zellen) oder mit pMSCV-RAS^{V12}-Vektor (RAS-infizierte Zellen). Im Weiteren erwähnte Kontroll-Zellen (Ktr) bzw. RAS-infizierte Zellen (Ras) enthalten somit als genetischen Hintergrund onkogenes MLL-ENL-ER (**Abb. 7**).

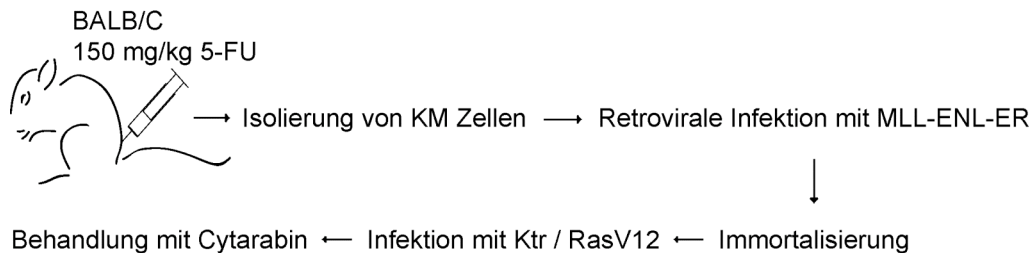


Abb. 7: Schematische Darstellung des MLL-ENL-ER induzierbaren Zellsystems. Um hämatopoetische Stammzellen anzureichern, wurde 5 Tage vor Entnahme der Knochenmark-Zellen (KM), 5-Fluorouracil (5-FU) in die Mäuse injiziert. Nach der Isolierung der Stammzellen wurden diese mit retroviralem MLL-ENL-ER Vektor infiziert und dreimal in Methylzellulose replatiert (Immortalisierung). Anschließend wurden die Zellen in Suspension kultiviert, expandiert und mit pMSCV-Leervektor (Ktr) bzw. pMSCV-RAS^{V12} (RASV12) infiziert.

4.1.1 RAS-infizierte Zellen zeigen Aktivierung des Onkogens

Um die Expression von aktivem Ras in den immortalen HSC nach der Infektion nachzuweisen, wurden die Zellen lysiert und mit GST-fusioniertem Raf1-Proteinen inkubiert. GST-Raf1 ist an Glutathion-Sepharose gebunden, so dass aktives Ras durch die Bindung an Raf1 co-präzipitiert und durch einen anschließenden Western-Blot nachgewiesen werden kann. Um den Einfluss von Cytarabin auf die Ras-Aktivität zu untersuchen, wurden die Zellen für 1 bzw. 3 Stunden mit 50 μ M Cytarabin behandelt. Die Präzipitate von Kontroll-Zellen (Ktr.) bzw. RAS-infizierten Zellen (Ras) wurden nach der Auftrennung im Polyacrylamid-Gel geblottet und mit Ras-Antikörper detektiert (Aktives Ras). Parallel wurden die Gesamt-Zelllysate geblottet und mit Ras-, bzw. phospho-Erk Antikörper inkubiert. Das Ergebnis zeigt, dass Ras in den RAS-infizierten Zellen überexprimiert und unabhängig von der Behandlung mit Cytarabin, aktiv war (**Abb. 8**).

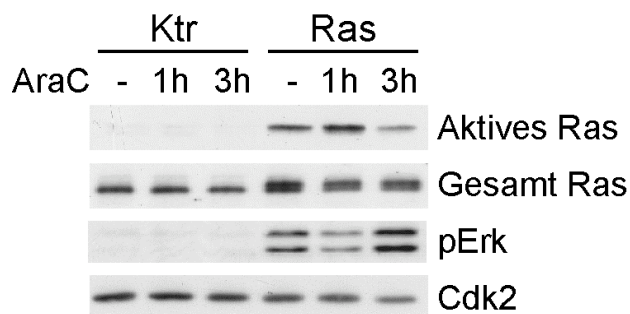


Abb. 8: MLL-ENL-ER Zellen exprimieren nach der Infektion aktives Ras. Für den Nachweis von aktivem Ras wurden die Lysate von Kontroll-Zellen und *RAS*-infizierten Zellen mit GST-Raf1-gekoppelten *Beads* inkubiert. Aktives Ras bindet an GST-Raf1 und wird co-präzipitiert. Die Präzipitate wurden geblottet und mit Antikörpern gegen Ras inkubiert (aktives Ras). Parallel wurden 25 µg der Gesamtllysate geblottet und mit Antikörpern gegen Ras (gesamt Ras) und phospho-Erk inkubiert. Cdk2 diente als Ladekontrolle.

4.1.2 *RAS*^{V12} hat keinen Einfluss auf die Expression von MLL-ENL-ER und die Genexpression von MLL-ENL Zielgenen

Um zu testen, ob die Infektion mit onkogenem *RAS* die Expression von MLL-ENL-ER verändert, wurde die RNA von Kontroll-Zellen und *RAS*-infizierten Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und die Expression von MLL-ENL-ER analysiert. Dazu wurde eine PCR durchgeführt und das entstandene Produkt mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese sichtbar gemacht. Die Expression von MLL-ENL-ER war in den *RAS*-infizierten Zellen unverändert (**Abb. 9**). Die Aktivität des MLL-ENL-ER Proteins wurde anhand der Expressionsprofile der MLL-ENL-ER Zielgene *meis1* und *hoxa9* untersucht (Zeisig, 2004 #65). Da diese nach dem Abschalten von MLL-ENL-ER herunterreguliert werden, wurden Kontroll-Zellen und *RAS*-infizierte Zellen für 10 Tage in An- und Abwesenheit von 4-OHT kultiviert und die Expression dieser Gene mit Hilfe der qRT-PCR analysiert. Es zeigte sich, dass in *RAS*-infizierten Zellen die Expression dieser Gene nicht verändert war (**Abb. 9B**), was darauf hinweist, dass onkogenes Ras die Aktivität von MLL-ENL-ER nicht beeinflusst und keinen MLL-ENL-unabhängigen Effekt auf die Gene ausübt. Das Abschalten von MLL-ENL-ER in den Zellen bewirkte außerdem, dass diese differenzierten. Die Expressionsanalysen der Differenzierungsmarker *ly6g* (Gr1) und *itgam* (Mac1) in An- und Abwesenheit von 4-OHT zeigten eine Induktion der Gene in Abwesenheit von 4-OHT in beiden Zelllinien, was daraufhin weist, dass die Expression von *RAS*^{V12} die Differenzierung der Zellen nicht blockierte (**Abb. 9C**).

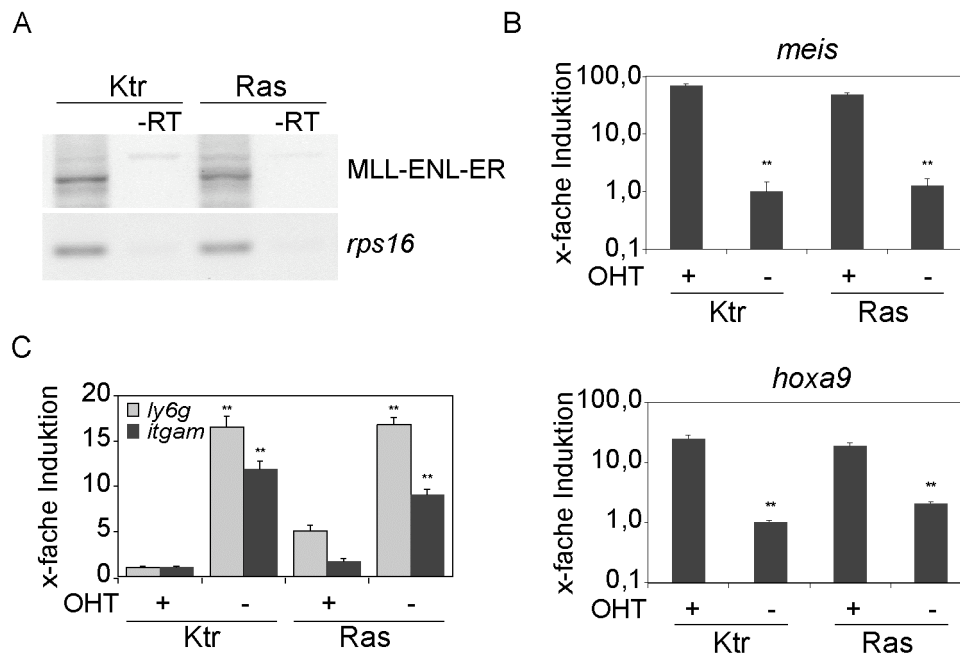


Abb. 9: Die Expression von MLL-ENL-ER und MLL-ENL-ER Zielgenen wird durch RAS^{V12} nicht beeinflusst. (A) Die Expression von MLL-ENL-ER wurde mit einer RT-PCR und anschließender Agarosegelelektrophorese analysiert. *Rps16* diente als Mengenkontrolle der eingesetzten cDNA. (B) Kontroll-Zellen und *RAS*-infizierte Zellen wurden für 10 Tage in Abwesenheit von 4-OHT kultiviert. Die Expressionsanalyse von *meis* und *hoxa9* erfolgte mit Hilfe einer qRT-PCR. Gezeigt ist die x-fache Induktion bezogen auf Ktr -4-OHT, die auf den Wert 1 gesetzt wurde. (C) Die Induktion der Differenzierung wurde durch die Kultivierung der Zellen in Abwesenheit von 4-OHT ausgelöst. Die Analyse der Expression der Differenzierungsmarker erfolgte durch die qRT-PCR Methode. Alle Zielgene wurden auf die Expression von *rps16* bezogen. Ktr +4-OHT wurde auf den Wert 1 gesetzt und die x-fache Induktion darauf bezogen. ** Sterne ($p < 0,01$) zeigen statistisch signifikante Unterschiede innerhalb der Zelllinien, die in An- bzw. Abwesenheit von 4-OHT kultiviert wurden. RT = Reverse Transkriptase.

4.2 Effekt von Cytarabin auf Kontroll-Zellen und *RAS*-infizierte Zellen

Um zu untersuchen, ob onkogenes *RAS* die Wirkung von Cytarabin verändert, wurden im Folgenden Kontroll-Zellen und *RAS*-infizierte Zellen nach der Cytarabin-Behandlung hinsichtlich Zell-Vitalität und klonogenem Verhalten untersucht.

4.2.1 Die Behandlung mit Cytarabin wirkt gleichermaßen auf die Vitalität von Kontroll-Zellen und *RAS*-infizierten Zellen

Um die Auswirkung von Cytarabin auf die Überlebensfähigkeit der Zellen zu untersuchen, wurden jeweils 100.000 Kontroll-Zellen und *RAS*-infizierte Zellen ausgesät und entweder unbehandelt oder für 24 Stunden mit 10 bzw. 100 nM Cytarabin behandelt. Nach der Anfärbung der toten Zellen mit Trypanblau erfolgte eine Auszählung der ungefärbten, lebenden Zellen mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer. Es lag kein Unterschied in der Anzahl der lebenden Kontroll-Zellen und *RAS*-infizierten Zellen nach Cytarabin-Behandlung vor, auch nicht, wenn die Zellen mit der höheren Cytarabin-Dosierung inkubiert wurden (**Abb. 10**). Da die Anzahl der Kontroll-Zellen im unbehandelten Zustand nach 24 Stunden Kultivierung höher war als die der *RAS*-infizierten Zellen, war der relative Effekt von Cytarabin auf die Kontroll-Zellen sogar etwas stärker als auf die *RAS*-infizierten Zellen. D.h. die *RAS*-infizierten Zellen waren im Vergleich zu den Kontroll-Zellen unempfindlicher gegenüber der Cytarabin-Behandlung.

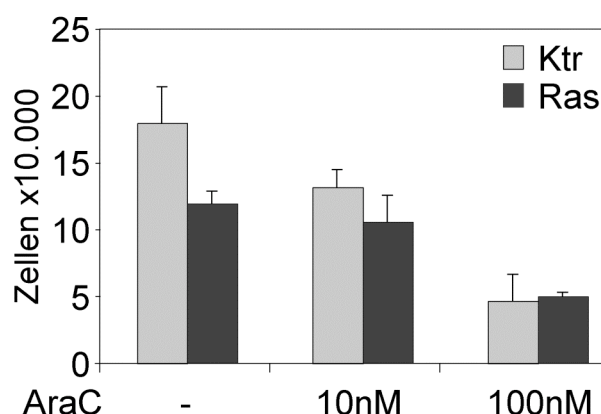


Abb. 10: Kontroll-Zellen und *RAS*-infizierte Zellen zeigen keinen Unterschied in der Lebend-Zellzahl nach Behandlung mit Cytarabin. 100.000 Zellen wurden ausgesät und für 24 Stunden mit 10 bzw. 100 nM Cytarabin behandelt. Nach Trypanblau-Ausschluss wurden die lebenden Zellen mit Hilfe der Neubauer Zählkammer bestimmt.

4.2.2 Cytarabin wirkt in beiden Zelllinien gleichermaßen auf die Zellen in der S-Phase

Onkogenes Ras aktiviert verschiedene Signalkaskaden und fördert die Zellteilung, was mit einer verstärkten Replikation der Zellen einhergeht (Feramisco, 1984 #78). Um zu untersuchen, ob sich das Proliferationsverhalten der *RAS*-infizierten Zellen unter dem

Einfluss von Cytarabin im Vergleich zu den Kontroll-Zellen ändert, wurde eine zweidimensionale Durchflusszytometrie (2D-FACS) durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mit Propidiumjodid (PI) und Bromodeoxyuridin (BrdU) gefärbt.

PI interkaliert in doppelsträngige DNA, und BrdU wird während der Replikation an Stelle von Desoxythymidintriphosphat in die DNA eingebaut. BrdU markiert damit spezifisch Zellen, die sich in der S-Phase des Zellzyklus befinden. Dadurch kann eine genaue Auftrennung von Zellen in der Sub-G1-, G1-, S- und G2 Phase des Zellzyklus erfolgen.

Die Zellen wurden zwei unterschiedlichen Behandlungen mit Cytarabin unterzogen: einem Puls und einer Dauerinkubation. Für den Cytarabin-Puls wurden die Zellen für 3 Stunden mit 1 μ M Cytarabin behandelt, anschließend mit PBS gewaschen und weitere 21 Stunden in Medium ohne Cytarabin kultiviert. Für die Dauerinkubation wurden die Zellen durchgängig für 24 Stunden mit 1 μ M Cytarabin inkubiert. Bevor die Zellen geerntet wurden, erfolgte eine Behandlung mit 10 μ M BrdU für 1 Stunde. Anschließend wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und sowohl mit einem fluoreszenzgekoppelten Antikörper gegen BrdU als auch mit Propidiumjodid, inkubiert. Im Durchflusszytometer konnte eine Zuordnung und quantitative Auswertung der Zellen in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus erfolgen.

Im unbehandelten Zustand war der prozentuale Anteil der *RAS*-infizierten Zellen in der G1- und G2-Phase des Zellzyklus größer als bei den Kontroll-Zellen. Gleichzeitig befanden sich weniger *RAS*-infizierte Zellen in der S- und Sub-G1 Phase. Nach der Cytarabin-Puls-Behandlung betrug der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen (sub-G1) in beiden Zelllinien 20% und die Zellen in der S-Phase reduzierten sich um die Hälfte (19% bzw. 15%). Nach der Dauerinkubation mit Cytarabin befanden sich 40% der Kontroll-Zellen und 47% der *RAS*-infizierten Zellen in der Sub-G1-Phase. In der S-Phase des Zellzyklus konnten in beiden Zelllinien weniger als 1% der Zellen detektiert werden (**Abb. 11**). Cytarabin hemmte zu gleichen Teilen die Replikation in beiden Zelllinien und induzierte Apoptose.

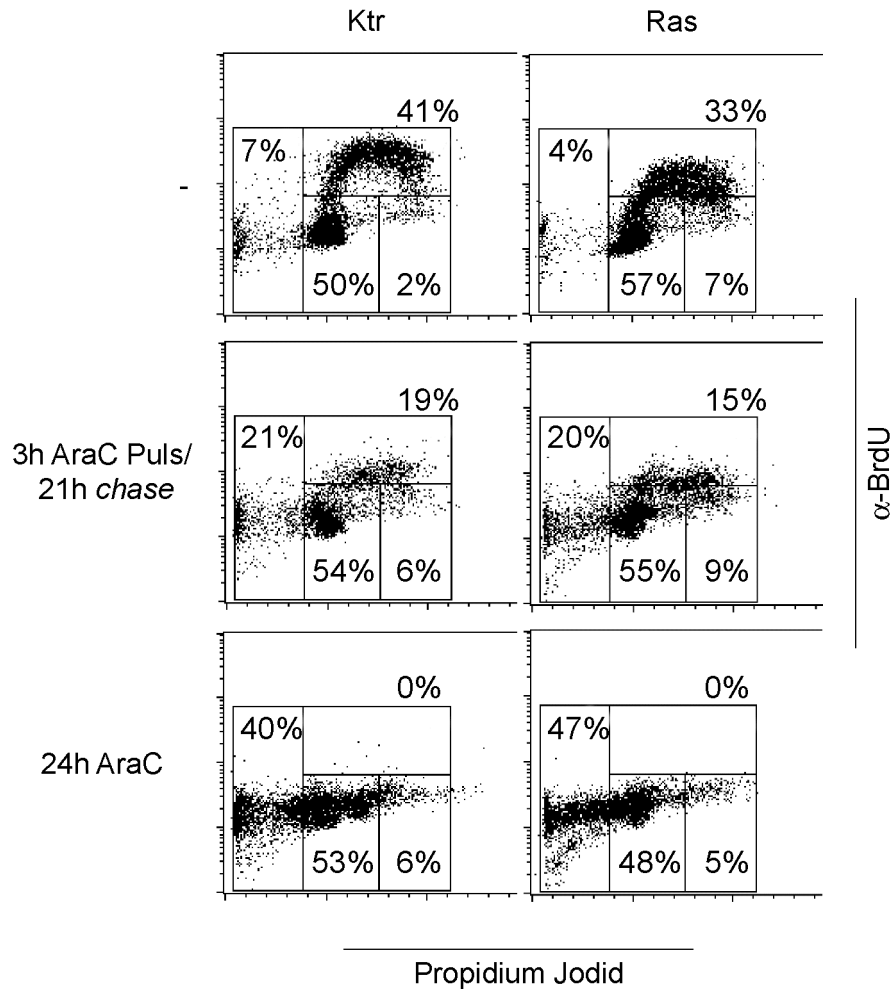


Abb. 11: Cytarabin hemmt die Replikation und induziert Apoptose in Kontroll-Zellen und RAS-infizierten Zellen. Für die 2D-FACS-Analyse wurden unbehandelte, Cytarabin-Puls (3h) und Cytarabin-dauerinkubierte Zellen (24h) vor der Ernte mit 10 μ M BrdU für eine Stunde inkubiert. Nach Fixierung und Permeabilisierung erfolgte eine Färbung mit PI und einem fluoreszenz-markierten Antikörper gegen BrdU. PI interkaliert in doppelsträngige DNA und BrdU wird während der Replikation in die DNA eingebaut. Die Abbildung zeigt die Auftrennung der Zellen in die Sub-G1-, G1-, S- und G2-Phase. Die Zahlen geben die prozentuale Verteilung der Zellen in diesen Zellzyklusphasen an.

4.2.3 RAS-infizierte Zellen zeigen ein vermindertes klonogenes Potential nach Cytarabin-Behandlung

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die Behandlung mit Cytarabin auf das klonogene Potential der Zellen hat (3.1.1.2.6), wurden 100.000 Zellen ausgesät, für 24 Stunden mit Cytarabin behandelt, anschließend mit PBS gewaschen und jeweils 3.000 Zellen in Duplikaten in Anwesenheit von 4-OHT und Zytokinen in Methylzellulose ausgesät. Die Kolonien wurden nach 4 Tagen Inkubation bei 37°C mit Iodonitrotetrazolium (INT) ge-

färbt und gezählt. Das klonogene Potential wurde von zwei MLL-ENL Klonen (Klon 1 und Klon 2) bestimmt, die unabhängig voneinander generiert und mit *RAS* infiziert worden waren.

Während unbehandelte und mit niedrigeren Konzentrationen Cytarabin-behandelte Kontroll-Zellen und *RAS*-infizierte Zellen keinen Unterschied in der Koloniebildung aufwiesen, führte die Behandlung der Zellen mit höheren Cytarabin-Konzentrationen zu einer signifikant verminderten Bildung von Kolonien bei den *RAS*-infizierten Zellen (**Abb. 12**). In dem zweiten MLL-ENL-Klon war die Koloniebildung der *RAS*-infizierten Zellen nach der Behandlung mit höheren Konzentrationen Cytarabin (350 nM) im Vergleich zu den Kontroll-Zellen signifikant eingeschränkt (**Abb. 12D**). Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass innerhalb der *RAS*-infizierten Zellen eine Sub-Population von klonogenen Zellen durch die Behandlung mit höheren Konzentrationen Cytarabin eliminiert wird.

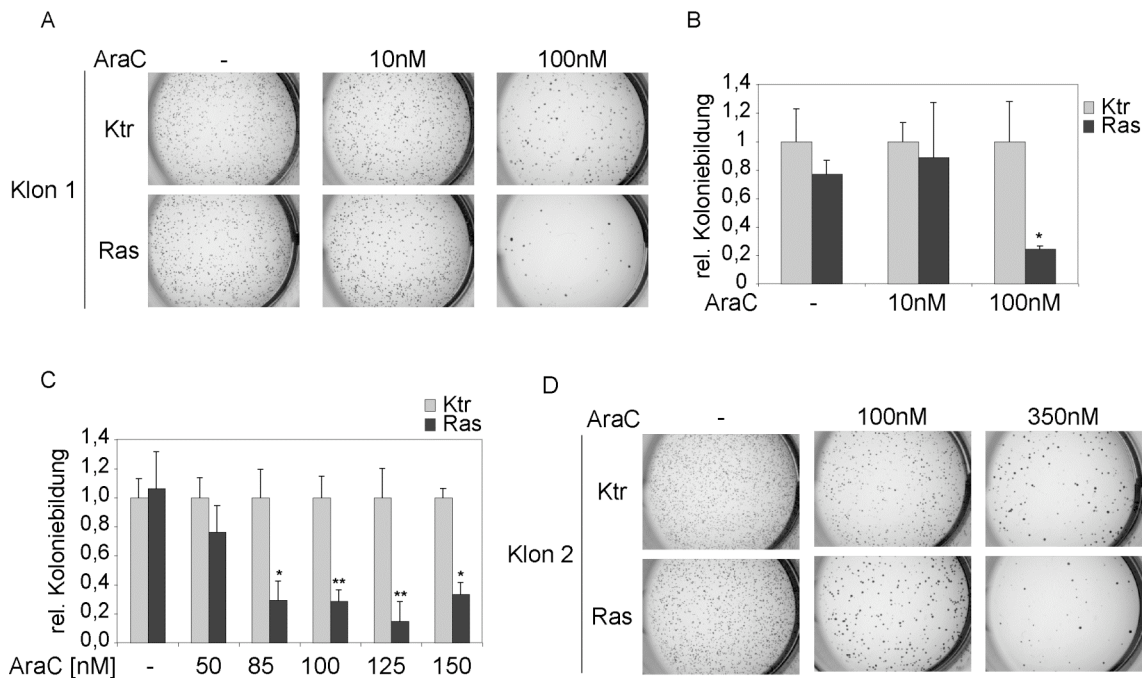


Abb. 12: RAS-infizierte Zellen zeigen eine eingeschränkte Klonogenität nach Cytarabin-Behandlung. (A) Für den Methylzellulose Assay wurden Kontroll-Zellen und RAS-infizierte Zellen (MLL-ENL Klon 1) unbehandelt oder für 24 Stunden mit 10 bzw. 100 nM Cytarabin kultiviert, gewaschen und in Duplikaten zu jeweils 3.000 Zellen in Methylzellulose ausgesät. Nach 4 Tagen Inkubation bei 37 °C wurden die Kolonien mit INT gefärbt. (B) Quantifizierung des Methylzellulose Assays in (A). Die Kolonien wurden gezählt und die Anzahl der Kolonien der Kontroll-Zellen auf den Wert 1 gesetzt. Relativ zu den Kontroll-Zellen wurde die Anzahl der Kolonien der RAS-infizierten Zellen aufgetragen. * = $p < 0,05$, markiert einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Kontroll-Zellen und RAS-infizierten Zellen, behandelt mit 100 nM Cytarabin. (C) Quantifizierung eines Methylzellulose Assay bei dem die Zellen (MLL-ENL Klon 1) mit steigenden Konzentrationen Cytarabin (50 nM, 85 nM, 100 nM, 125 nM, 150 nM) für 24 Stunden behandelt wurden. Aufgetragen ist die relative Koloniebildung, wobei die Kontroll-Zellen jeweils auf den Wert 1 gesetzt wurden (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$). (D) Methylzellulose Assay eines zweiten MLL-ENL-Klons, der mit RAS^{V12} bzw. Leervektor infiziert worden war. Für den Methylzellulose Assay wurden Kontroll-Zellen und RAS-infizierte Zellen unbehandelt oder für 24 Stunden mit 100 bzw. 350 nM Cytarabin kultiviert, gewaschen und in Duplikaten zu jeweils 3.000 Zellen in Methylzellulose ausgesät. Nach 4 Tagen Inkubation bei 37 °C wurden die Kolonien mit INT gefärbt.

4.2.4 RAS-infizierte Zellen zeigen verminderte Klonogenität nach Daunorubicin- und Etoposid-Behandlung

Ist der Effekt von Cytarabin auf die Klonogenität der RAS-infizierten Zellen spezifisch oder zeigen andere Chemotherapeutika wie Daunorubicin und Etoposid ähnliche Wirkungen? Daunorubicin und Etoposid sind Topoisomerase II-Inhibitoren und werden im Rahmen einer Kombinationschemotherapie bei akuten Leukämien eingesetzt. Um die-

se Frage zu beantworten wurde die Klonogenität der Zellen, nach der Behandlung mit diesen Substanzen, untersucht. Es wurden 100.000 Zellen ausgesät und mit 10 bzw. 25 nM Daunorubicin oder mit 50 bzw. 250 nM Etoposid für 24 Stunden behandelt. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und jeweils 3.000 Zellen in Methylzellulose ausgesät. Nach fünf Tagen wurden die Kolonien gefärbt und gezählt. Nach der Daunorubicin- bzw. Etoposid-Behandlung war die Koloniebildung der *RAS*-infizierten Zellen im Vergleich zu den Kontroll-Zellen eingeschränkt (**Abb. 13A,C**). Die Quantifizierung der Kolonien zeigt, dass bei 10 nM Daunorubicin bzw. 50 und 250 nM Etoposid ein statistisch signifikanter Unterschied in der Koloniebildung zwischen Kontroll-Zellen und *RAS*-infizierten Zellen besteht (**Abb. 13B,D**). Diese Ergebnisse zeigen, dass klonogene Zellen innerhalb der *RAS*-infizierten Zellen durch die Behandlung mit Daunorubicin und Etoposid eliminiert werden und dies kein spezifischer Effekt von Cytarabin ist.

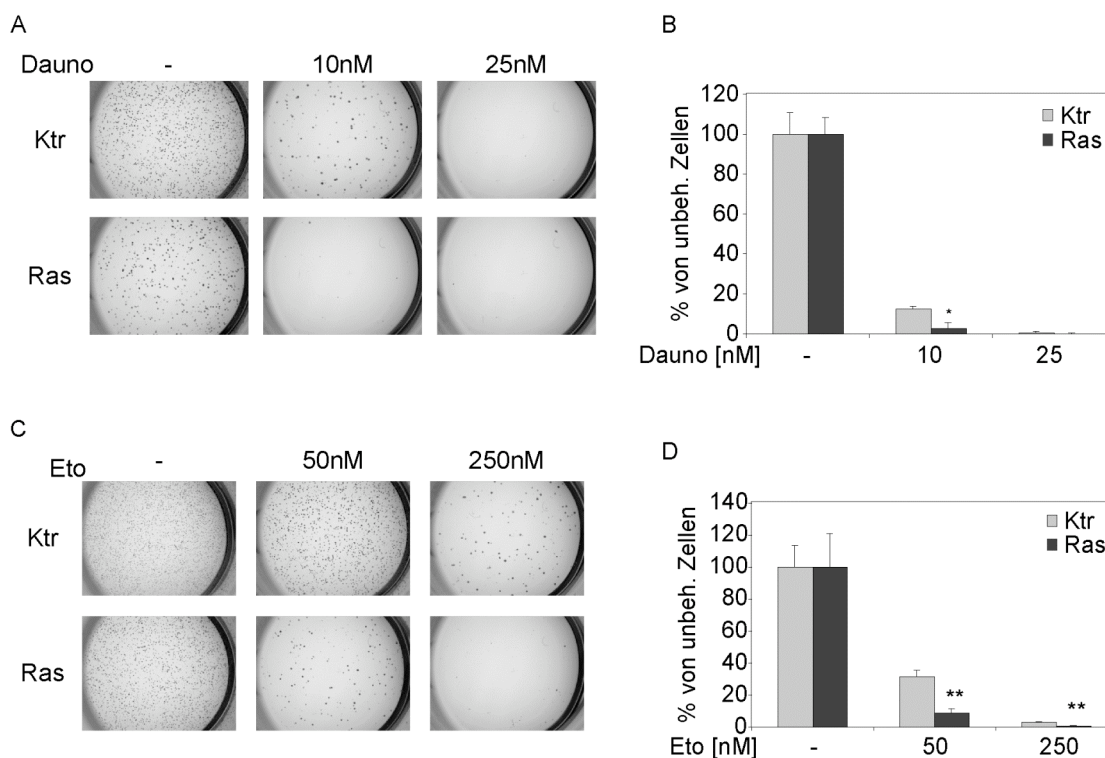


Abb. 13: Verminderte Klonogenität der *RAS*-infizierten Zellen nach Daunorubicin- und Etoposid-Behandlung. (A) Methylzellulose-Assay nach der Behandlung mit Daunorubicin. 100.000 Kontroll- und *RAS*-infizierte Zellen wurden ausgesät und mit den angegebenen Konzentrationen Daunorubicin für 24 Stunden behandelt. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und 3.000 Zellen ausplattiert. Nach 5-tägiger Inkubation bei 37 °C wurden die Kolonien gefärbt. (B) Quantifizierung der Kolonien nach Daunorubicin-Behandlung. (C) Methylzellulose-Assay nach der Behandlung mit den angegebenen Konzentrationen Etoposid. (D) Quantifizierung der Kolonien nach Etoposid-Behandlung. Die Asterisks markieren einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Kontroll-Zellen und *RAS*-infizierten Zellen (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$).

4.2.4.1 Kontroll-Zellen und RAS-infizierte Zellen bestehen aus unterschiedlichen Populationen

Ein Grund warum Cytarabin keine unterschiedlichen Effekte auf die Zellen in der Suspension zeigte, wohl aber im klonogenen Assay, könnte darin liegen, dass die Zelllinien aus unterschiedlichen Populationen bestehen, die sich hinsichtlich der Klonogenität heterogen verhalten. Der Effekt von Cytarabin als auch von Daunorubicin und Etoposid auf die Gesamtzellpopulation könnte durch eine große Anzahl von nicht klonogenen Zellen bestimmt worden sein, während der Effekt auf eine möglicherweise kleine Gruppe von klonogenen Zellen nicht sichtbar war.

Um dies zu untersuchen, wurden die Zellen mit Hilfe von Antikörper-gekoppelten magnetischen *Beads* für den Differenzierungsmarker Mac1 und den Stammzellmarker c-kit sortiert und jeweils 3.000 Zellen in Methylzellulose ausplattiert. Nach fünf Tagen wurden die Kolonien gefärbt und ausgezählt.

Nur eine Fraktion von Zellen in beiden Zelllinien exprimieren den Differenzierungsmarker Mac1 bzw. den Stammzellmarker c-kit (**Abb. 14A,B**) und die klonogene Population durch Isolierung der Mac1-negativen bzw. c-kit-positiven Population angereichert werden konnte (**Abb. 14C**).

A

Mac1 Sort

Zellen x 10.000	Zellen insgesamt	Mac1 positiv	Mac1 negativ
Ktr	2401	646 (27%)	1755 (73%)
Ras	3312	560 (17%)	2752 (83%)

B

c-kit Sort

Zellen x 10.000	Zellen insgesamt	c-kit positiv	c-kit negativ
Ktr	98	59 (60%)	39 (40%)
Ras	109	50 (46%)	59 (54%)

C

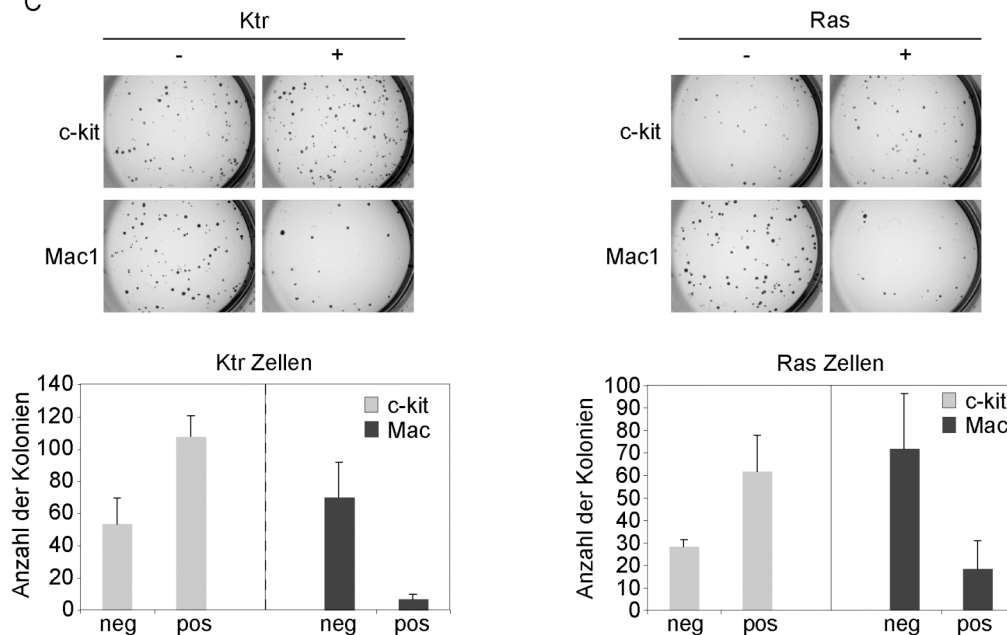


Abb. 14: Kontroll-Zellen und *RAS*-infizierte Zellen bestehen aus unterschiedlich klonogenen Populationen. (A) Kontroll- und *RAS*-infizierte Zellen wurden über Antikörper-gebundene magnetische Kügelchen nach Mac1-negativen und -positiven bzw. (B) c-kit-negativen und -positiven Populationen sortiert. (C) Methyzellulose Assay der Mac1- bzw. c-kit-sortierten Zellen. Jeweils 3.000 Zellen wurden ausplattiert und die Kolonien nach 5 Tagen mit INT gefärbt. Die Quantifizierung zeigt eine Anreicherung von klonogenen Zellen in den Mac1-negativen und c-kit-positiven Populationen.

4.3 Einfluss von Cytarabin auf die Apoptoserate von Kontroll-Zellen und *RAS*-infizierten Zellen

Im folgenden Abschnitt wurde untersucht, ob die verminderte Klonogenität der *RAS*-infizierten Zellen auf erhöhte Apoptoserate nach Cytarabin-Behandlung zurückzuführen ist. Dazu wurde eine Expressionsanalyse des Apoptose Marker Noxa sowie eine aktive-Caspase 3 FACS-Analyse durchgeführt (1.2.3).

4.3.1 Cytarabin induziert den Apoptose Marker *nox* in Kontroll-Zellen und RAS-infizierten Zellen.

Die Expressionsanalyse von *nox* erfolgte mit Hilfe einer qRT-PCR. 500.000 Zellen wurden ausgesät und mit 350 nM Cytarabin für 8, 16 und 24 Stunden behandelt. Anschließend wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die Expression von *nox* wurde in beiden Zelllinien durch die Cytarabin-Behandlung induziert und erreichte nach 16 Stunden den höchsten Wert. In den Kontroll-Zellen lag zu allen Zeitpunkten eine höhere Expression von *nox* vor, wobei die Differenz nicht signifikant war (**Abb. 15**).

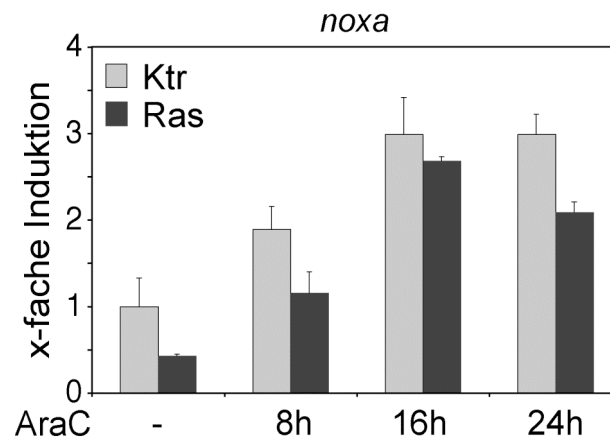


Abb. 15: Kein signifikanter Unterschied in der Expression von *nox* in Kontroll-Zellen und RAS-infizierten Zellen nach Cytarabin-Behandlung. Mit Hilfe einer qRT-PCR wurde das Expressionsprofil von *nox* in Abhängigkeit von der Dauer der Cytarabin-Inkubation untersucht. Dafür wurden 500.000 Zellen ausgesät und für 8, 16, und 24 Stunden mit 350 nM Cytarabin behandelt. Nach Isolation der Gesamt-RNA erfolgte das Umschreiben in cDNA. Für die cDNA Synthese wurden 2 µg RNA eingesetzt. Alle Werte wurden auf die Expression des Gens *rps16* bezogen. Gezeigt ist die x-fache Induktion/Repression bezogen auf Ktr unbehandelt, die auf den Wert 1 gesetzt wurde.

4.3.2 RAS-infizierte Zellen zeigen weniger Caspase-Spaltung nach Cytarabin-Behandlung

Für die Quantifizierung von aktiver Caspase 3, wurden 1×10^6 Kontroll-Zellen und RAS-infizierte Zellen ausgesät und für 4 bzw. 20 Stunden mit 1 µM Cytarabin behandelt. Im Anschluss an die Behandlung wurden die Zellen geerntet, mit einem gegen aktive-Caspase 3 gerichteten, fluoreszenz-gekoppelten Antikörper inkubiert und in einem Durchflusszytometer analysiert.

Die Anzahl der aktiven-Caspase 3–positiven Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten ist in **Abb. 16** dargestellt. In den markierten Bereichen befinden sich die Zellen, die aktive-Caspase 3-positiv gefärbt sind.

Im unbehandelten Zustand waren nur wenige aktive-Caspase 3–positive Zellen zu detektieren, zwischen Kontroll-Zellen und *RAS*-infizierten Zellen lag kein Unterschied vor. Auch nach 4 Stunden Inkubation mit Cytarabin war der Anteil apoptotischer Zellen in beiden Zelllinien gering (2 bzw. 3%). Nach 20 Stunden Inkubation mit Cytarabin zeigten 40% der Kontroll-Zellen eine aktive-Caspase 3 Färbungen, wohingegen lediglich 18% der *RAS*-infizierten Zellen positiv für aktive-Caspase 3 waren. An der Verteilung der Zellen über die y-Achse (*Forward scatter*) ist zu erkennen, dass die *RAS*-infizierten Zellen deutlich größer waren als die Kontroll-Zellen. Dies deutet auf eine stärkere Differenzierung der *RAS*-infizierten Zellen hin.

Für die eingeschränkte Klonogenität der *RAS*-infizierten Zellen war Apoptose, nach diesen Ergebnissen, nicht verantwortlich, da *RAS*-infizierte Zellen sogar weniger Apoptose aufwiesen als Kontroll-Zellen, deren Klonogenität durch höher dosiertes Cytarabin geringer beeinflusst wurde (siehe **Abb. 12**).

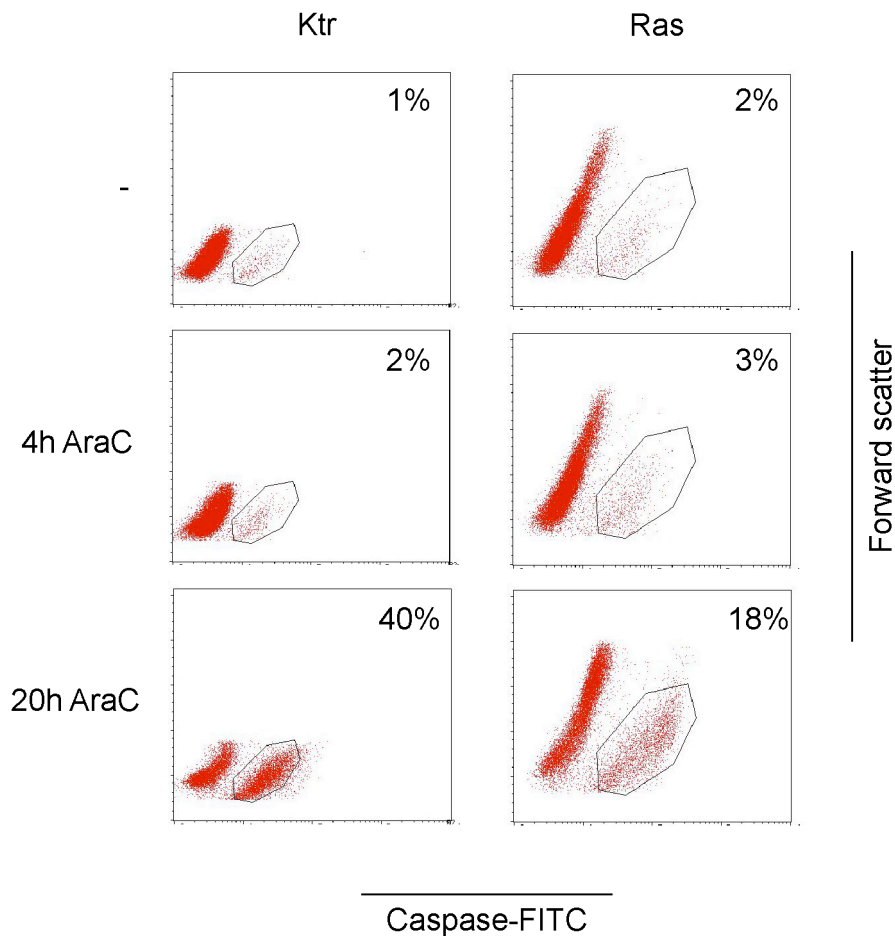


Abb. 16: RAS-infizierte Zellen zeigen weniger aktive-Caspase 3 nach Cytarabin-Behandlung. Für die FACS-Analyse wurden 1×10^6 Zellen ausgesät mit $1 \mu\text{M}$ Cytarabin behandelt und nach 4 und 20 Stunden geerntet. Anschließend wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit einem fluoreszenz-gekoppelten Antikörper gegen aktive-Caspase 3 gefärbt. Die Zahlen geben die Anzahl der aktiven-Caspase 3-positiven Zellen in Prozent an.

4.4 RAS-infizierte Zellen zeigen Eigenschaften von seneszenten Zellen

Onkogene, darunter RAS^{V12} , lösen in primären Zellen Seneszenz aus (Bartkova, 2006 #2; Di Micco, 2006 #1), siehe Abschnitt 1.2.2. Seneszente Zellen exprimieren das Enzym β -Galaktosidase und weisen eine erhöhte Expression von p53, p21^{Cip1} und des Ink4/Arf Locus (mit den Tumor Suppressoren p16^{Ink4a}, p19^{Arf} und p15^{Ink4b}) auf. In der Publikation von Collado (2006) sind einige zusätzliche Marker beschrieben, die in seneszenten Zellen hochreguliert werden, wie z.B. das Gen *bhlhb2* (Dec1, Differentiated embryo-chondrocyte 1).

4.4.1 Cytarabin induziert die Expression der Seneszenzmarker p15^{Ink4b} und Dec1

Um zu untersuchen, ob die Zellen nach Cytarabin-Behandlung einen seneszenten Phänotyp annehmen, wurden die Expressionsprofile von *ink4b* (p15^{Ink4b}) und *bhlhb2* (Dec1) analysiert. Für die Expressionsanalyse wurden die Zellen für 8, 16 und 24 Stunden mit 350 nM Cytarabin behandelt und anschließend eine qRT-PCR durchgeführt. Cytarabin induzierte die Expression der Gene *ink4b* (**Abb. 17A**) und *bhlhb2* (**Abb. 17B**) sowohl in Kontroll-Zellen als auch in *RAS*-infizierten Zellen. Die Expression des Tumorsuppressors *ink4b* war in den *RAS*-infizierten Zellen nach 8 und 16 Stunden Cytarabin-Behandlung signifikant stärker, nach 24 Stunden Cytarabin-Behandlung war die Expression des Gens in den Kontroll-Zellen stärker. Die *bhlhb2*-Expression war in den *RAS*-infizierten Zellen sowohl im unbehandelten Zustand als auch nach 12 und 24 Stunden Cytarabin-Behandlung signifikant höher (**Abb. 17**).

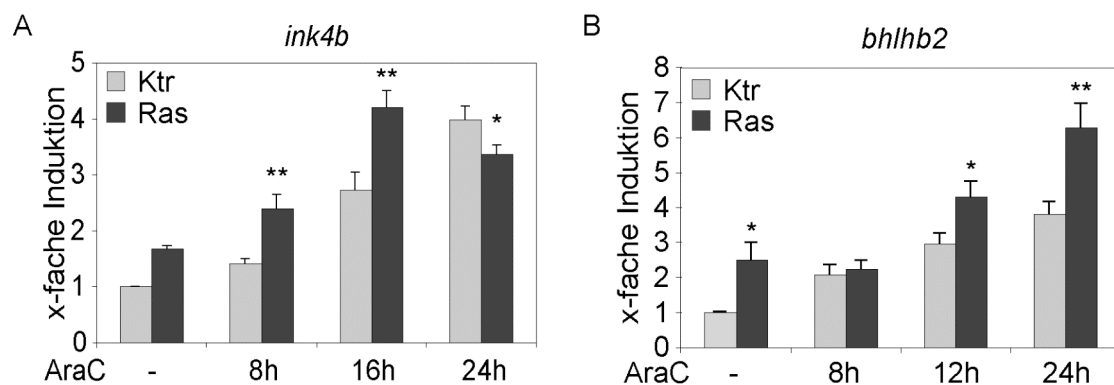


Abb. 17: Cytarabin induziert die Expression der Seneszenzmarker *ink4b* und *bhlhb2* in Kontroll-Zellen und *RAS*-infizierten Zellen. Mit Hilfe einer qRT-PCR wurden die Expressionsprofile der Marker *ink4b* (A) und *bhlhb2* (B) in Abhängigkeit von der Dauer der Cytarabin-Inkubation untersucht. Jeweils 500.000 Zellen wurden ausgesät und für die angegebenen Stunden mit 350 nM Cytarabin behandelt. Die Expression der Zielgene wurde auf die Expression des Gens *rps16* bezogen. Die Induktion bezieht sich auf Ktr unbehandelt, die auf den Wert eins gesetzt wurde. Die Asterisken zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen Kontroll-Zellen und *RAS*-infizierten Zellen (* = p<0,05; ** = p<0,01). Die Expression der Marker ist in *RAS*-infizierten Zellen stärker, aber auch in Kontroll-Zellen durch Cytarabin induziert.

4.4.2 *RAS*-infizierte Zellen zeigen keine erhöhte β -Galaktosidase Aktivität im Vergleich zu Kontroll-Zellen

Das Enzym β -Galaktosidase, eine Glykosidase, die Bindungen von β -Galactopyranosiden hydrolysiert. Senescente Zellen exprimieren dieses Enzym (Dimri, 1995 #82), wodurch die Zellen in der Lage sind, das Substrat X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid) zu Galactose und einen blauen, wasserunlöslichen Indigo-Farbstoff zu hydrolysieren, was zu einer Blaufärbung der Zellen führt.

Um zu untersuchen, ob die Cytarabin-behandelten Zellen das Enzym exprimieren, wurden unbehandelte und Cytarabin-behandelte Zellen in Glutardialdehyd fixiert und für 16 Stunden in X-Gal-Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Zytospins auf Objektträger zentrifugiert und auf Blaufärbung untersucht. Die Cytarabin-Behandlung führte sowohl in Kontroll-Zellen, als auch in *RAS*-infizierten Zellen, zu einer Blaufärbung (**Abb. 18**). Dieses Ergebnis geht mit den Ergebnissen der Expressionsanalysen von *ink4b* und *bhlhb2* einher. Alle getesteten Seneszenzmarker wurden durch die Cytarabin-Behandlung induziert, was daraufhinweist, dass Cytarabin Seneszenz auslösen kann, wobei die Induktion von Seneszenz nicht für die eingeschränkte Klonogenität der *RAS*-infizierten Zellen verantwortlich ist.

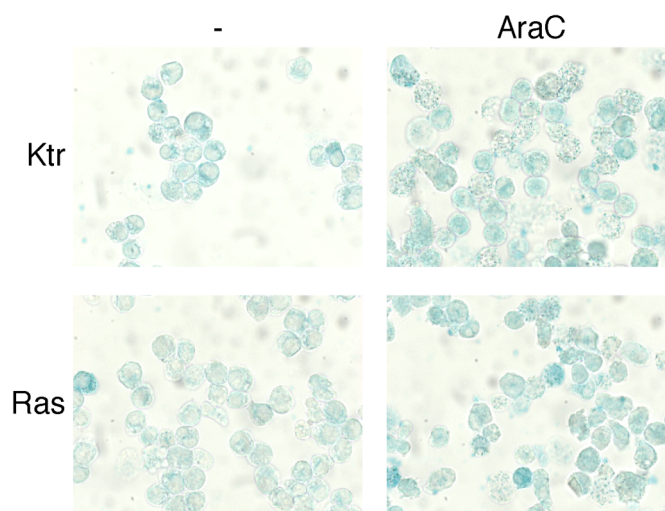


Abb. 18: Kein Unterschied der β -Galaktosidase Aktivität zwischen Kontroll-Zellen und *RAS*-infizierten Zellen. Für die Färbung wurden 1×10^6 Zellen ausgesät und für 24 Stunden mit 350 nM Cytarabin behandelt. Zwei Tage nach der Cytarabin-Behandlung wurden die Zellen in Glutardialdehyd fixiert und über Nacht mit Färbelösung inkubiert. Die Cytarabin-Behandlung löst in beiden Zelllinien eine Blaufärbung aus, was auf die Aktivität der β -Galaktosidase zurückzuführen ist.

4.4.3 RAS-infizierte Zellen zeigen hohe Expressionslevel von p53, p21^{Cip1}, p16^{Ink4a} und p19^{Arf}

Wie bereits unter Abschnitt 4.4 erwähnt, ist die Expression der Tumorsuppressoren p53, p21^{Cip1}, p16^{Ink4a} und p19^{Arf} in seneszenten Zellen erhöht. Um die Expressionslevel dieser Proteine in Kontroll-Zellen und RAS-infizierten Zellen miteinander zu vergleichen, wurden Zelllysate von unbehandelten, Cytarabin- und UV-behandelten Zellen hergestellt und geblottet. Der Nachweis der Proteine erfolgte durch die Detektion mit Antikörpern. Da HSC generell eine niedrige p53 Expression zeigen, wurden die Zellen mit UV-B Licht bestrahlt, um eine Induktion von p53 herbeizuführen. Die Proteinlevel von p53 waren in beiden Zelllinien nur schwach zu detektieren, wobei die RAS-infizierten Zellen im unbehandelten Zustand höhere Proteinmengen von p53 aufwiesen.

Nach Cytarabin-Behandlung und vor allem nach UV-B Bestrahlung wurde p53 ausschließlich in den RAS-infizierten Zellen auf detektierbare Level induziert (**Abb. 19**). Die Induktion von p53 nach DNA Schaden gibt einen Hinweis darauf, dass der Tumorsuppressor in diesen Zellen in seiner wildtyp Form vorlag.

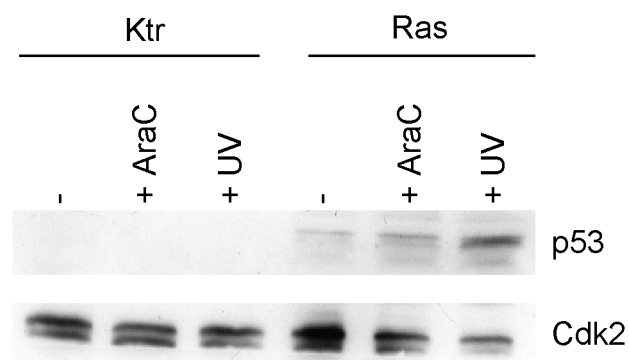


Abb. 19: p53 ist in RAS-infizierten Zellen stärker exprimiert und wird durch Cytarabin-Behandlung und UV-B Bestrahlung induziert. Für den Western-Blot wurden die Zellen für 5 Stunden mit 100 μ M Cytarabin behandelt. Die UV-B Bestrahlung erfolgte für 3,5 min, woraufhin die Zellen für weitere 5 Stunden kultiviert wurden. Nach der NP-40 Lyse wurden 250 μ g Proteinlysate geblottet. Die Detektion erfolgte mit einem Antikörper gegen p53. Cdk2 diente als Ladekontrolle.

Auch die Expression der Proteine p21^{Cip1}, p16^{Ink4a} und p19^{Arf} war in den RAS-infizierten Zellen deutlich erhöht (**Abb. 20**). Im Gegensatz zu p53 waren die Level der p16^{Ink4a} und

p19^{Arf} Proteine in den *RAS*-infizierten Zellen schon im unbehandelten Zustand hoch und wurden durch die Cytarabin-Behandlung nicht weiter induziert. p21^{Cip1} zeigte ebenfalls eine stärkere Expression im unbehandelten Zustand, wurde aber durch die Cytarabin-Behandlung weiter induziert.

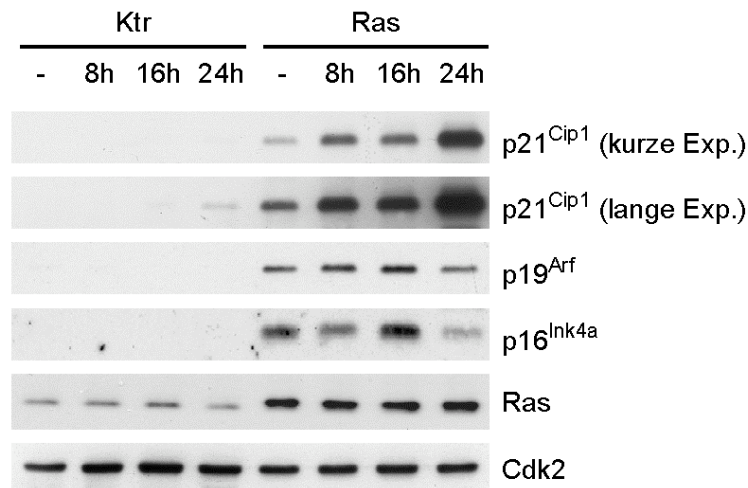


Abb. 20: *RAS*-infizierte Zellen zeigen hohe Proteinlevel von p21^{Cip1}, p16^{Ink4a} und p19^{Arf}. Die Zellen wurden für den Western-Blot für 8, 16, und 24 Stunden mit 50 µM Cytarabin behandelt. 50 µg des Gesamtzelllysates wurden geblottet und die Proteine mit spezifischen Antikörpern detektiert. Cdk2 diente als Ladekontrolle. Exp. = Exposition

4.5 *RAS*-infizierte Zellen zeigen verstärkte Aktivierung der DNA-Schadenssignalkaskade

Cytarabin verursacht Einzelstrangbrüche, die in der Zelle zu replikativem Stress führen (1.2.1.1). Im Folgenden wurde untersucht, ob *RAS* die Aktivierung der DNA-Schadenssignalkaskade und damit die Wirkung von Cytarabin verändert.

4.5.1 Chk1 und H2A.x werden in *RAS*-infizierten Zellen nach Cytarabin-Behandlung stärker phosphoryliert

Um zu testen, ob onkogenes Ras die DNA-Schadensantwort moduliert, wurden die Zellen für 1, 3, und 6 Stunden mit 50 µM Cytarabin behandelt und mittels Western-Blot

die Phosphorylierung der Kontrollproteine Chk1 und H2A.x mit Phosphorylierungsspezifischen Antikörpern nachgewiesen. Die Behandlung der Zellen mit Cytarabin führte in den *RAS*-infizierten Zellen bereits nach einer Stunde zur Phosphorylierung von Chk1 (**Abb. 21**), wobei das Phosphorylierungs-Signal nur transient war und bereits nach 6 Stunden nur noch schwach nachzuweisen war. Das Ergebnis dieses Western-Blots zeigt, dass onkogenes Ras die Phosphorylierung von Chk1 und damit die DNA-Schadenssignalkaskade verstärkt.

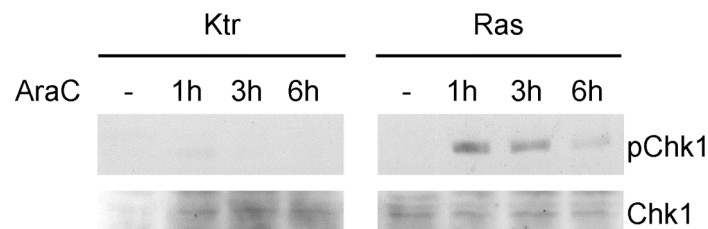


Abb. 21: *RAS*-infizierte Zellen zeigen eine stärkere Phosphorylierung von Chk1 nach Cytarabin-Behandlung. Die Zellen wurden für 1, 3 und 6 Stunden mit 50 μ M Cytarabin inkubiert und 50 μ g des Gesamtzelllysates geblottet. Die Detektion von phosphoryliertem Chk1 erfolgte mit einem Antikörper, der spezifisch phosphoryliertes Serin 345 an Chk1 erkennt. Chk1 ist in beiden Zelllinien exprimiert und diente als Ladekontrolle.

Ist die Aktivierung des Kontrollproteins von der Konzentration der schädigenden Substanz abhängig? Um dieser Frage nachzugehen wurden 2×10^6 Zellen ausgesät und mit steigenden Konzentrationen Cytarabin (350 nM, 1 μ M, 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M) für 1 Stunde behandelt. 25 μ g der Zelllysate wurden geblottet und mit dem Phosphorylierungsspezifischen Chk1 Antikörper inkubiert. Sowohl in den Kontroll-Zellen als auch in den *RAS*-infizierten Zellen nahm die Phosphorylierung von Chk1 mit steigender Cytarabin-Konzentration zu, die Menge an phosphoryliertem Chk1-Protein war in den *RAS*-infizierten Zellen jedoch höher (**Abb. 22**). Das Ergebnis zeigt, dass eine Abhängigkeit zwischen der Phosphorylierung von Chk1 und der Konzentration von Cytarabin besteht.

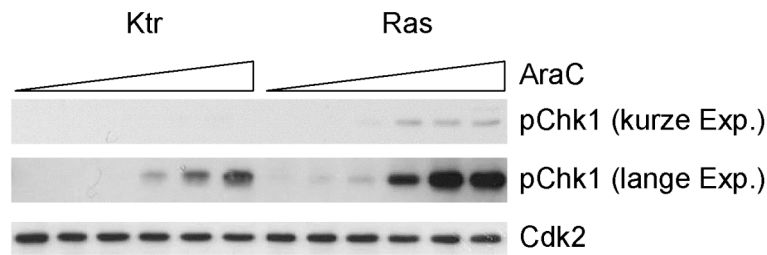


Abb. 22: Die Phosphorylierung von Chk1 ist von der Cytarabin-Konzentration abhängig. 2×10^6 Kontroll-Zellen und RAS-infizierte Zellen wurden unbehandelt geerntet bzw. ausgesät und mit steigenden Konzentrationen Cytarabin (350 nM, 1 μ M, 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M) für 1 Stunde behandelt. 25 μ g der Zelllysate wurden geblottet. Der Nachweis von phosphoryliertem Chk1 erfolgte mit einem Antikörper der phosphoryliertes Serin 345 an Chk1 detektiert. Cdk2 diente als Ladekontrolle. Exp. = Exposition. Beide Zelllinien zeigen eine Abhängigkeit zwischen Phosphorylierung von Chk1 und Cytarabin-Konzentration, die Aktivierung von Chk1 ist in den RAS-infizierten Zellen stärker.

Um die Phosphorylierung der Histon-Variante H2A.x zu untersuchen, wurden die Zellen für 1, 3 und 6 Stunden mit 100 μ M Cytarabin behandelt und als Kontrolle für 3,5 min mit UV-B bestrahlt und nachfolgend für 5 Stunden kultiviert. Die Lyse der Zellpellets erfolgte mit Ripa-Puffer, um auch Chromatin-assoziierte Proteine im Gesamtzelllysat anzureichern. 100 μ g des Lysates wurden geblottet und phosphoryliertes H2A.x mit einem Antikörper detektiert. Die Phosphorylierung von H2A.x konnte in den Kontroll-Zellen nach Cytarabin-Behandlung schwach und nach UV-B Bestrahlung deutlich nachgewiesen werden, was auf funktionell intaktes H2A.x hinweist. In den RAS-infizierten Zellen war die Phosphorylierung von H2A.x nach 3 und 6 Stunden Cytarabin-Behandlung und nach UV-B Bestrahlung zu detektieren (**Abb. 23**). Das Ergebnis lässt erkennen, dass weitere Proteine der DNA-Schadenssignalkaskade durch onkogenes Ras verstärkt aktiviert werden.

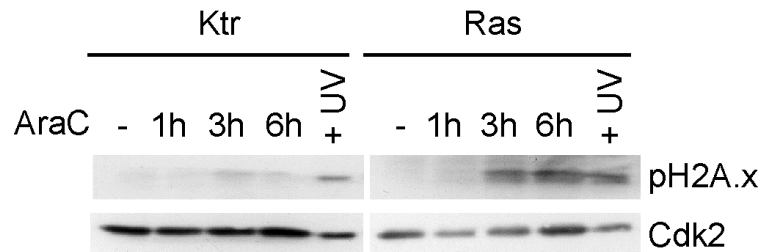


Abb. 23: Die Phosphorylierung von H2A.x ist in RAS-infizierten Zellen stärker als in Kontroll-Zellen. Für den Western-Blot wurden 100 µg Ripa-Lysat der unbehandelten und Cytarabin-behandelten bzw. UV-B-bestrahlten Zellen geblottet. Die Detektion erfolgte mit einem Antikörper, der nur an Serin 139 phosphoryliertes H2A.x erkennt. Cdk2 diente als Ladekontrolle. Die UV-B-bestrahlten Zellen wurden als Kontrolle verwendet und zeigen, dass auch Kontroll-Zellen funktionales H2A.x-Protein enthielten.

Um die Phosphorylierung von H2A.x zu verifizieren, wurde eine Immunfluoreszenz durchgeführt. Dazu wurden unbehandelte und für 1 Stunde mit 100 µM Cytarabin-behandelte Zellen mit Hilfe eines Zytospins auf Objektträger zentrifugiert, anschließend fixiert, permeabilisiert und mit dem phospho-H2A.x (Serin 139)-Antikörper inkubiert. Die Detektion von gebundenem Antikörper erfolgte mit einem sekundären FITC-gekoppelten Antikörper. Phospho-H2A.x Foci konnten sowohl in den unbehandelten RAS-infizierten Zellen als auch in den Cytarabin-behandelten Zellen erkannt werden, während die Kontroll-Zellen phospho-H2A.x nur in den Cytarabin-behandelten Proben aufwiesen (**Abb. 24**). Die Behandlung der RAS-infizierten Zellen mit Cytarabin führte zu einer Zunahme der phospho-H2A.x positiven Zellen. Der Nachweis von phosphoryliertem H2A.x mit Hilfe der Immunfluoreszenz zeigt, dass onkogenes Ras die DNA-Schadenssignalkaskade direkt, ohne den Zusatz von DNA-schädigenden Substanzen, aktivierte.

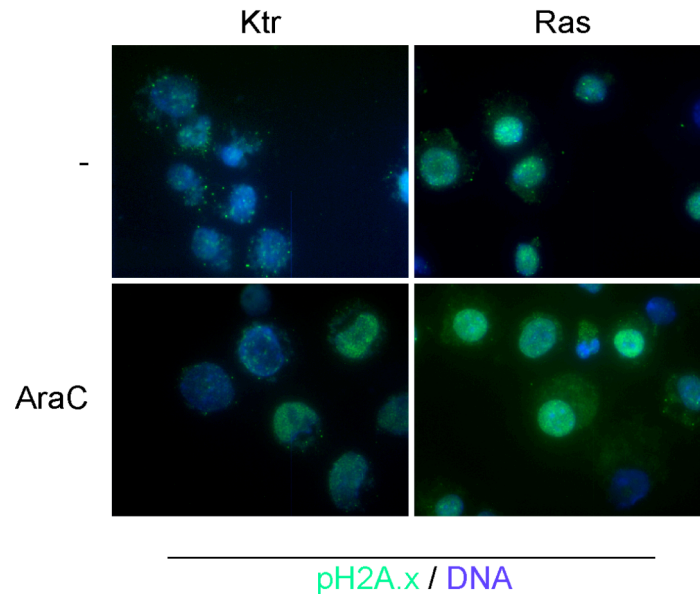


Abb. 24: RAS-infizierte Zellen zeigen bereits im unbehandelten Zustand phosphoryliertes H2A.x. Die Kontroll-Zellen und RAS-infizierten Zellen wurden nach einstündiger Behandlung mit 100 μM Cytarabin mit Hilfe eines Zytospins auf Objektträger zentrifugiert, mit PFA fixiert, permeabilisiert und mit phospho-H2A.x (Serin 139)-Antikörper für eine Stunde inkubiert. Die Detektion von phosphoryliertem H2A.x erfolgte mit einem sekundären FITC-gelabelten Antikörper. Die Färbung der DNA erfolgte mit Hoechst-Farbstoff.

Phosphoryliertes Chk1 wurde zusätzlich mit Hilfe der Durchflusszytometrie nachgewiesen. Für die intrazelluläre phospho-Chk1 FACS-Analyse wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit phospho-Chk1 Antikörper inkubiert. Als sekundärer Antikörper wurde ein mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa488-gekoppelter Antikörper verwendet. Die RAS-infizierten Zellen wiesen schon im unbehandelten Zustand einen erhöhten Anteil an phosphoryliertem Chk1 auf, was an der Zunahme der Alexa488-Intensität zu erkennen ist (**Abb. 25A**). Die Quantifizierung der Ergebnisse (**Abb. 25B**) zeigt, dass im unbehandelten Zustand 1% der Kontroll-Zellen und 4% der RAS-infizierten Zellen für phosphoryliertes Chk1 positiv gefärbt waren. Durch die Behandlung mit Cytarabin erhöht sich der Anteil der phospho-Chk1-positiven Kontroll-Zellen auf 17% während der Anteil bei den RAS-infizierten Zellen auf 34% anstieg. Die Histogramme der unbehandelten und Cytarabin-behandelten Kontroll-Zellen bzw. der unbehandelten und Cytarabin-behandelten RAS-infizierten Zellen sind in **Abb. 25C** dargestellt. Bei dem Nachweis von phosphoryliertem Chk1 mittels Durchflusszytometrie wird deutlich, dass die Expression von onkogenem Ras die DNA-Schadenssignalkaskade aktiviert, und die Schädigung der DNA durch Cytarabin diese weiter verstärkt.

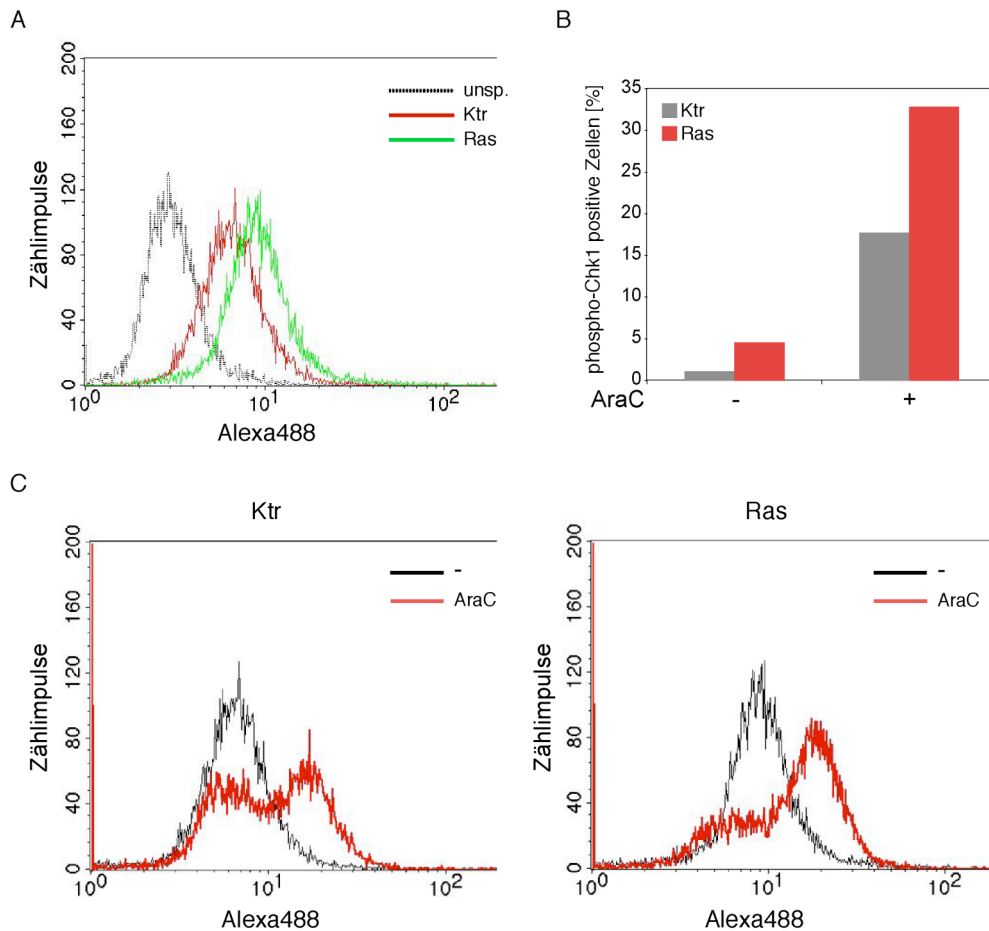


Abb. 25: RAS-infizierte Zellen zeigen verstärkte Chk1-Phosphorylierung im unbehandelten Zustand. (A) Histogramm der unbehandelten Kontroll-Zellen und RAS-infizierten Zellen. 1×10^6 Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und mit einem Antikörper gegen phosphoryliertes Chk1 inkubiert, der durch einen Alexa488-gekoppelten sekundären Antikörper detektiert wurde. Die Analyse der Zellen erfolgte mit dem FACScalibur. (B) Quantifizierung von (C). (C) Histogramme der unbehandelten und Cytarabin-behandelten Kontroll-Zellen bzw. RAS-infizierten Zellen. 1×10^6 Zellen wurden ausgesät und für 1 Stunde mit $100 \mu\text{M}$ Cytarabin behandelt. Die schwarze Linie zeigt die phospho-Chk1 Färbung der unbehandelten Zellen, die rote Linie die der Cytarabin-behandelten Zellen. unsp. = unspezifisch (Kontroll-Antikörper).

4.5.2 Chk1 wird in RAS-infizierten Zellen nach Daunorubicin- und Etoposid-Behandlung stärker phosphoryliert

Neben Cytarabin werden auch Daunorubicin und Etoposid für die Behandlung der AML eingesetzt. Um zu untersuchen, ob Chk1 auch nach der Behandlung mit Daunorubicin und Etoposid phosphoryliert wird, wurden 2×10^6 Zellen für 1 Stunde mit steigenden Konzentrationen Daunorubicin bzw. Etoposid behandelt, die Lysate geblottet und die Phosphorylierung von Chk1 mit einem phospho-spezifischen Antikörper nachgewiesen.

Sowohl die Behandlung mit Daunorubicin (**Abb. 26A**) als auch mit Etoposid (**Abb. 26B**) löste die Phosphorylierung von Chk1 aus. Wie schon bei Cytarabin war die Aktivierung des Kontrollproteins durch beide Substanzen in den *RAS*-infizierten Zellen stärker. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass *RAS*^{V12} die DNA-Schadenssignalkaskade direkt verstärkt, unabhängig von der Substanz, die den Schaden verursacht.

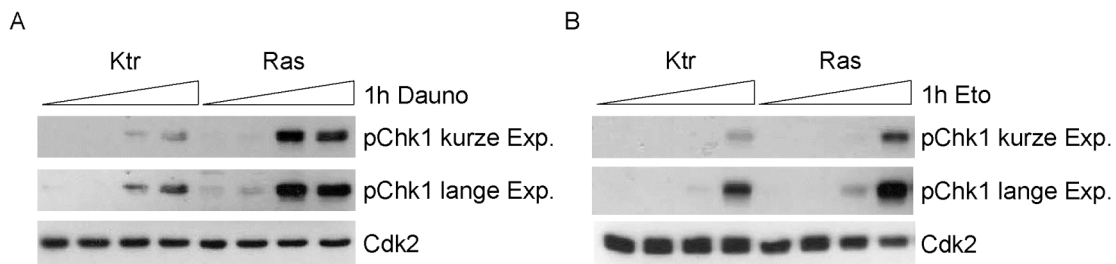


Abb. 26: Die Phosphorylierung von Chk1 ist nach Daunorubicin- und Etoposid-Behandlung in *RAS*-infizierten Zellen stärker. 2×10^6 Zellen wurden unbehandelt geerntet bzw. für den Western-Blot mit 1, 10 und 50 μM Daunorubicin (A) bzw. Etoposid (B) für 1 Stunde behandelt. Für den Nachweis von phosphoryliertem Chk1 wurden 25 μg Zelllysate geblottet und mit einem Chk1-Antikörper gegen phospho-Serin 345 inkubiert. Die Färbung für Cdk2 zeigt, dass vergleichbare Proteinmengen geladen wurden. Exp. = Exposition.

4.5.2.1 *Chk1* wird in differenzierten Zellen nur in Anwesenheit von *RAS*^{V12} phosphoryliert

Wie bereits unter Abschnitt 4 beschrieben, kann funktionelles MLL-ENL durch den Entzug von 4-OHT aus dem Kulturmedium abgeschaltet werden, woraufhin die Zellen nach 14-tägiger Kultivierung ausdifferenzieren (siehe **Abb. 9C**). Um der Frage nachzugehen, inwieweit aktives MLL-ENL-ER an der Aktivierung der Kontrollproteine beteiligt ist, wurden differenzierte Kontroll-Zellen bzw. *RAS*-infizierte Zellen auf die Phosphorylierung von Chk1 untersucht. Dazu wurden 1×10^6 Zellen ausgesät und mit 100 μM Cytarabin behandelt bzw. zur Kontrolle mit UV-B bestrahlt. Nach der angegebenen Inkubationszeit mit Cytarabin wurden die Zellen geerntet, lysiert und 50 μg des Gesamtzelllysates geblottet. Die UV-bestrahlten Zellen wurden 1 bzw. 3 Stunden nach der UV-B Bestrahlung für die Zellyse geerntet. Nach Abschalten von MLL-ENL-ER lag nur in den *RAS*-infizierten Zellen phosphoryliertes Chk1 vor, welches nach Cytarabin-Behandlung weiter aktiviert wurde (**Abb. 27A**). In den differenzierten *RAS*-infizierten Zellen war die Aktivierung von Chk1 stärker als in den un-differenzierten Zellen

(Abb. 27B, pChk1 lange Exposition). Die Behandlung mit Cytarabin führte zu einer Zunahme der Phosphorylierung von Chk1 in beiden *RAS*-infizierten Zell-Populationen. Dieses Ergebnis zeigt, dass die verstärkte Phosphorylierung von Chk1 ein spezifischer Effekt von *RAS*^{V12} ist. Zudem wird deutlich, dass MLL-ENL-ER in *RAS*-infizierten Zellen die Aktivierung des Kontrollproteins inhibiert.

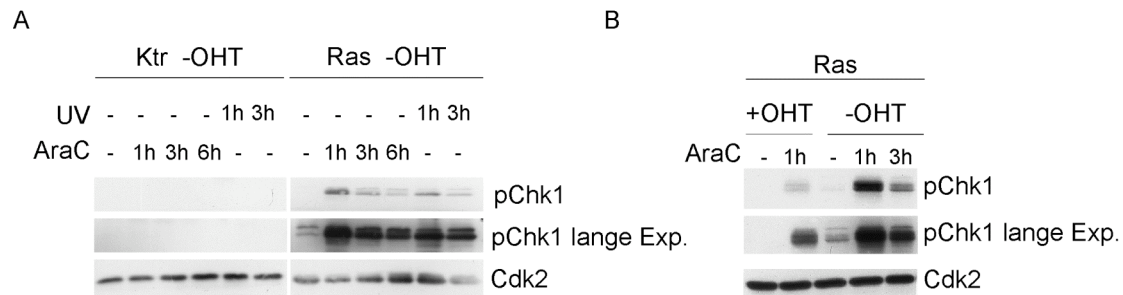


Abb. 27: In differenzierten Zellen ist die Phosphorylierung von Chk1 abhängig von *RAS*^{V12}. (A) Western-Blot von Kontroll-Zellen und *RAS*-infizierten Zellen, die 14 Tage in Abwesenheit von 4-OHT kultiviert wurden und mit UV-B für 3,5 min bestrahlt bzw. für die angegebenen Zeiten mit 100 μ M Cytarabin behandelt wurden. Nach UV-B Bestrahlung fand die Kultivierung der Zellen für weitere 1 und 3 Stunden statt. Von dem TNN-Lysat wurden 50 μ g geblottet und Chk1 mit einem phospho-spezifischem Antikörper (Serin 345) detektiert. (B) Western-Blot von *RAS*-infizierten Zellen, die in Anwesenheit bzw. in Abwesenheit von 4-OHT kultiviert und mit 100 μ M Cytarabin behandelt wurden. Verwendete Antikörper sind dieselben wie in (A). Cdk2 diente als Ladekontrolle. Exp. = Exposition.

4.5.3 ATM wird in *RAS*-infizierten Zellen nach DNA Schaden stärker phosphoryliert

Die Aktivierung der ATR-Kinase führt auch zur Aktivierung der ATM-Kinase (Stiff, 2006 #13). ATM wird an Serin 1981 durch ATR phosphoryliert, woraufhin das Protein homodimerisiert, die Kinase Chk2 aktiviert und ebenfalls eine Signalkaskade in Gang setzt, die zum Zellzyklus Arrest oder zur Apoptose führt (1.2.1.1.1). Um die Aktivierung von ATM zu testen, wurde eine Immunfluoreszenz mit spezifisch gegen phospho-ATM gerichteten Antikörpern durchgeführt (Daten von D. Rübsamen). Die Zellen wurden für 1 Stunde mit 100 μ M Cytarabin behandelt und anschließend sowohl unbehandelte als auch Cytarabin-behandelte Zellen mit Hilfe eines Zytospins auf Objektträger zentrifugiert. Nach Fixierung und Permeabilisierung wurden die Zellen mit einem primären Antikörper gegen phospho-ATM (Serin 1981) inkubiert. Die Detektion des gebundenen Antikörpers in der Zelle erfolgte mit Alexa488-gekoppeltem Antikörper. Eine phospho-

ATM-positive Färbung konnte ausschließlich in den *RAS*-infizierten Zellen nach Cytarabin-Behandlung detektiert werden (**Abb. 28**).

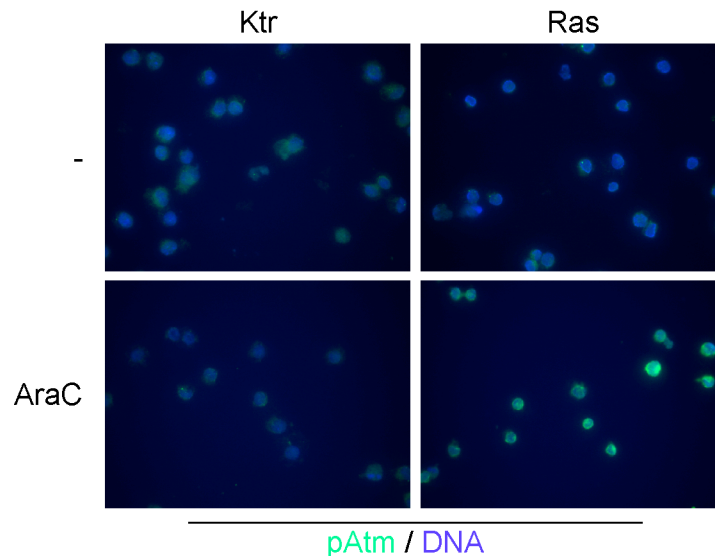


Abb. 28: Phosphorylierte ATM-Kinase ist nach Cytarabin-Behandlung nur in *RAS*-infizierten Zellen zu detektieren. Für die Immunfluoreszenz wurden die Zellen, entweder unbehandelt oder für 1 Stunde mit 100 μ M Cytarabin behandelt, mit Hilfe eines Zytospins auf Objektträger zentrifugiert. Nach Fixierung und Permeabilisierung wurden die Zellen mit einem primären Antikörper gegen phospho-ATM (Serin 1981) inkubiert. Die Detektion des phospho-ATM gebundenen Antikörpers erfolgte mit Alexa488-gekoppeltem Antikörper. Die DNA wurde mit Hoechst-Farbstoff gefärbt.

4.6 *RAS*^{V12} induziert Differenzierung

Onkogenes Ras kann in hämatopoetischen Zellen Differenzierung induzieren (Dorrell, 2004 #30; Hibi, 1993 #32). Ebenso ist beschrieben, dass Cytarabin Differenzierung auslösen kann (Huang, 1988 #91; Nagler, 1986 #92; Takagaki, 2005 #9). Wie in Abschnitt 4.2.4.1 gezeigt, sind differenzierte Zellen nicht mehr in der Lage, Kolonien in Methylzellulose zu bilden. Die unterschiedliche Klonogenität zwischen Kontroll-Zellen und *RAS*-infizierten Zellen nach Cytarabin-Behandlung (**Abb. 12**) könnte somit dadurch bedingt sein, dass *RAS*-infizierte Zellen stärker differenzieren, während Kontroll-Zellen ihre Stammzell-Eigenschaft (und somit Klonogenität) beibehalten.

4.6.1 Die Expression der Gene *ly6g* und *itgam* ist in *RAS*-infizierten Zellen verstärkt

Der Differenzierungsstatus von unbehandelten und Cytarabin-behandelten Zellen wurde auf mRNA- und Protein-Ebene sowie morphologisch untersucht. Mit Hilfe der qRT-PCR wurden Expressionsanalysen der Differenzierungsmarker *ly6g* (Gr1) und *itgam* (Mac1) durchgeführt, während der Nachweis der entsprechenden Proteinexpression mit Hilfe der Durchflusszytometrie erfolgte. Gr1 und Mac1 werden auf der Oberfläche von Makrophagen, Monozyten und Granulozyten exprimiert und markieren somit reife hämatopoetische Zellen (1.1).

Kontroll-Zellen und *RAS*-infizierte Zellen wurden für 8, 16 und 24 Stunden mit 350 nM Cytarabin behandelt, die RNA geerntet, in cDNA umgeschrieben und diese einer qRT-PCR unterzogen. Die Differenzierungs-Gene *ly6g* (**Abb. 29A**) bzw. *itgam* (**Abb. 29B**) wurden in den *RAS*-infizierten Zellen stärker exprimiert und nach Cytarabin-Behandlung weiter induziert. Die Expression der Differenzierungs-Gene war in den *RAS*-infizierten Zellen zu allen Zeitpunkten signifikant höher.

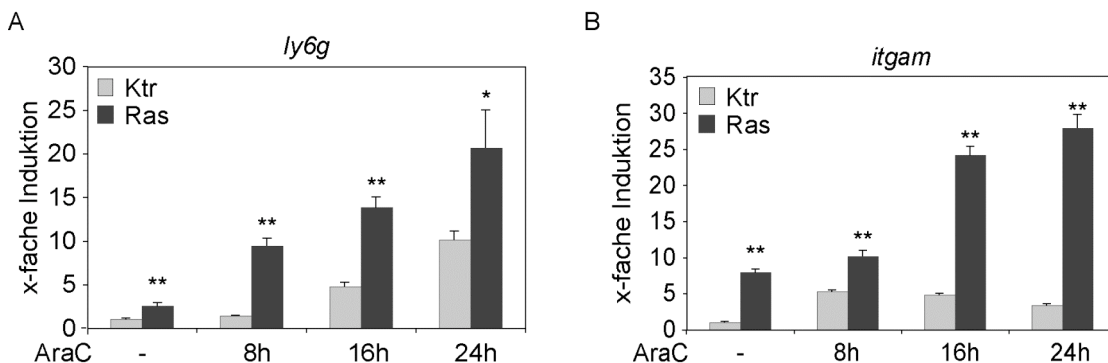


Abb. 29: *RAS*-infizierte Zellen zeigen eine stärkere Expression der Differenzierungsmarker *ly6g* (A) und *itgam* (B). Für die qRT-PCR wurden 1×10^6 Zellen ausgesät und mit 350 nM Cytarabin für die angegebenen Zeitintervalle behandelt. Als Referenz-Gen wurde *rps16* verwendet. Gezeigt ist die x-fache Induktion bezogen auf Ktr unbehandelt, die auf den Wert 1 gesetzt wurde. Die Asterisks zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen Kontroll-Zellen und *RAS*-infizierten Zellen (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$).

Die Expression der Oberflächenproteine Mac1 und Gr1 wurde mit der Durchflusszytometrie analysiert. 1×10^6 Zellen wurden ausgesät und für 24 Stunden mit 350 nM Cytarabin behandelt. Anschließend wurden unbehandelte und Cytarabin-behandelte Zellen mit PE-markierten Antikörpern gegen Mac1 bzw. Gr1 inkubiert. In beiden Zelllinien

wurde die Expression der Differenzierungsmarker durch die Behandlung mit Cytarabin erhöht. Die *RAS*-infizierten Zellen, sowohl unbehandelt als auch nach Cytarabin-Behandlung, zeigten aber eine stärkere Detektion von Mac1- und Gr1-Proteinen als die Kontroll-Zellen (**Abb. 30**), was daraufhin deutet, dass diese Zellen stärker differenziert waren.

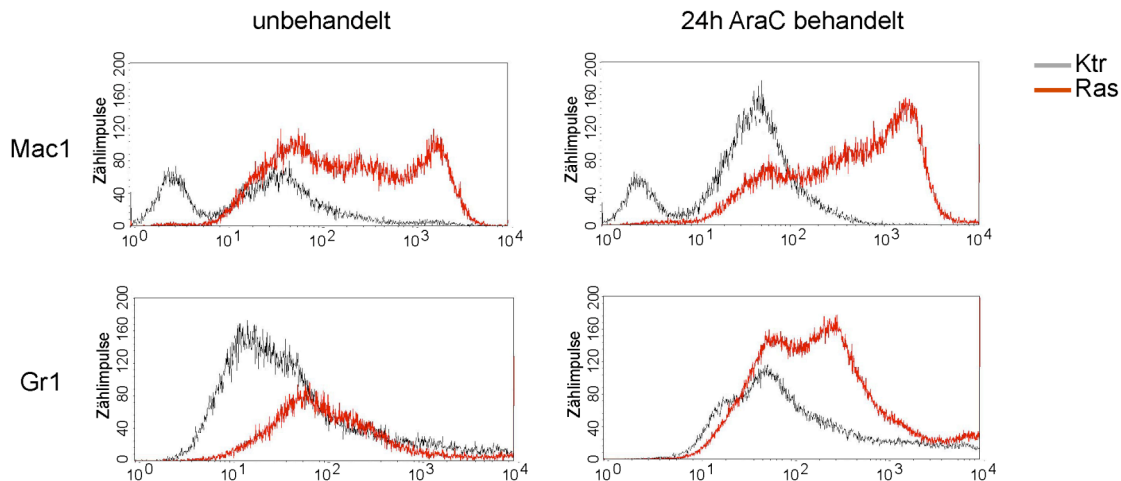


Abb. 30: *RAS*-infizierte Zellen zeigen eine stärkere Expression der Differenzierungsmarker Mac1 und Gr1. Für die FACS-Analyse wurden 1×10^6 Zellen ausgesät und mit 350 nM Cytarabin für 24 Stunden behandelt. Anschließend folgte die Färbung der Zellen mit PE-gekoppeltem anti-Gr1 bzw. anti-Mac1 Antikörper. *RAS*-infizierte Zellen sind differenzierter als Kontroll-Zellen, die Behandlung mit Cytarabin induziert aber die Expression der Differenzierungsmarker in beiden Zelllinien.

4.6.2 *RAS*-infizierte Zellen exprimieren den Stammzell-Marker c-kit schwächer

c-kit (CD117) ist ein Zytokin-Rezeptor, der vor allem auf der Oberfläche von hämatopoetischen Stammzellen (HSC) sowie multipotenten Progenitoren (MPP) und myeloiden Vorläuferzellen exprimiert wird. c-kit ist eine Typ III-Rezeptor-Tyrosin Kinase. Wenn der Rezeptor von seinem Liganden SCF (*stem cell factor*) gebunden wird, dimerisiert er und löst eine Signalkaskade über *second messenger* aus, die, je nach Zelltyp, zum Zell-Überleben, zur Proliferation oder Differenzierung führt. Wie in Kapitel 4.2.4.1 gezeigt, sind MLL-ENL-ER-infizierte Zellen positiv für den Stammzellmarker c-kit. Um die Expressin des Stammzellmarkers zu testen, wurde eine Expressionsanalyse mittels qRT-PCR durchgeführt. Dazu wurden 1×10^6 Zellen ausgesät und für 6 und 24 Stunden mit 350 nM Cytarabin behandelt. Die Kontroll-Zellen zeigten eine hohe *kit* Expression.

Im Vergleich dazu war diese in den *RAS*-infizierten Zellen deutlich herunter reguliert und wurde durch die Behandlung mit Cytarabin weiter reprimiert (**Abb. 31**).

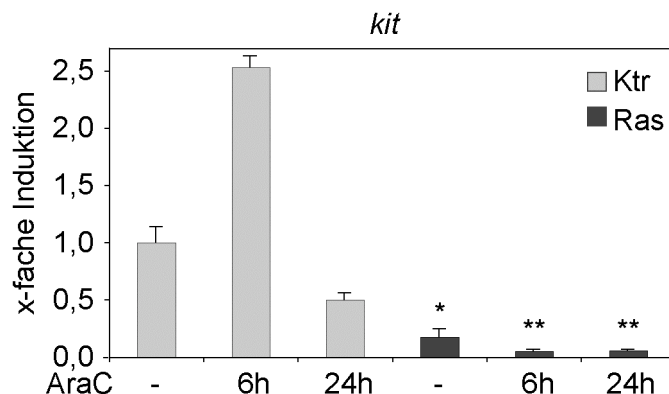


Abb. 31: Die Expression des Stammzellmarkers *kit* ist in *RAS*-infizierten Zellen herunter reguliert. Für die qRT-PCR wurden 1×10^6 Zellen ausgesät und mit 350 nM Cytarabin für 6 und 24 Stunden behandelt. *rps16* diente als Referenzgen. Gezeigt ist die x-fache Induktion/Repression bezogen auf Ktr unbehandelt, die auf den Wert 1 gesetzt wurde. Die Asterisks zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen Kontroll-Zellen und *RAS*-infizierten Zellen (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$).

4.6.3 *RAS*-infizierte Zellen zeigen eine differenzierte Morphologie nach Cytarabin-Behandlung

In den vorangegangenen Kapiteln konnte dargelegt werden, dass *RAS*-infizierte Zellen, vor allem nach Cytarabin-Behandlung, eine deutlich stärkere Expression von Differenzierungsmarkern aufweisen. Um die Morphologie der Zellen zu untersuchen, wurde eine Pappenheim-Färbung (May-Grünwald/Giemsa) durchgeführt (3.1.1.2.8). Hierzu wurden 1×10^6 Kontroll-Zellen und *RAS*-infizierte Zellen ausgesät und mit 350 nM Cytarabin für 24 Stunden behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Nach zwei Tagen Kultivierung in Medium ohne Cytarabin wurden 50.000 Zellen mit Hilfe eines Zytospins auf einen Objektträger zentrifugiert, luftgetrocknet und mit May-Grünwald/Giemsa-Lösungen gefärbt. Die Pappenheim-Färbung der unbehandelten und behandelten Kontroll-Zellen bzw. *RAS*-infizierten Zellen wies eine deutlich differenziertere Morphologie der Cytarabin-behandelten *RAS*-infizierten Zellen auf (**Abb. 32A**). Die Quantifizierung der Morphologie (**Abb. 32B**) zeigt, dass der Anteil der unreifen Blasten in Cytarabin-behandelten *RAS*-infizierten Zellen wesentlich geringer war als in Kontroll-Zellen (10% innerhalb der *RAS*-infizierten Zellen gegenüber 40% innerhalb der Kontroll-Zellen), wohingegen der Anteil differenzierter stabkerniger-

Zellen, segmentkerniger Granulozyten, Polymorphonukleare Zellen und Monozyten bzw. Makrophagen in den Cytarabin-behandelten *RAS*-infizierten Zellen am größten war.

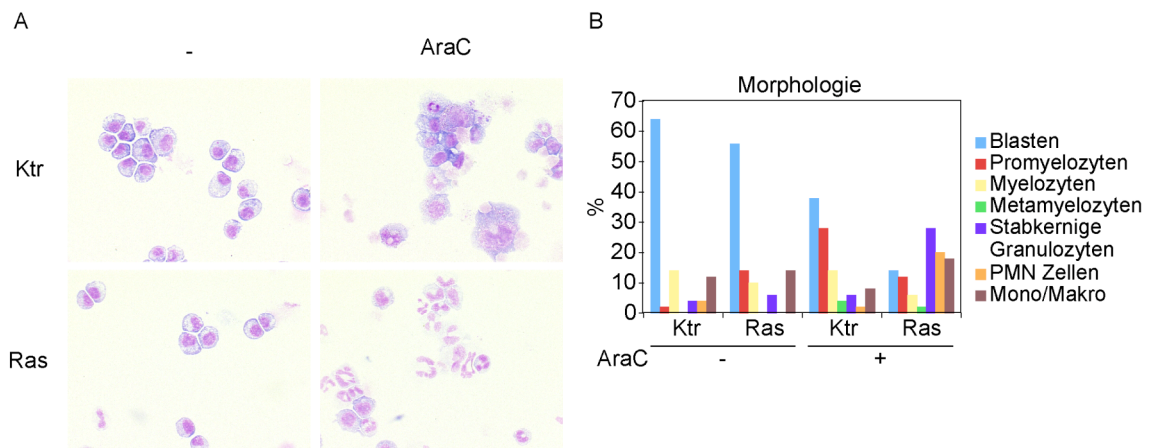


Abb. 32: *RAS*-infizierte Zellen weisen nach Cytarabin-Behandlung eine differenzierte Morphologie auf. (A) Pappenheim-Färbung von unbehandelten und Cytarabin-behandelten Kontroll-Zellen und *RAS*-infizierten Zellen. Behandelte Zellen wurden für 24 Stunden mit 350 nM Cytarabin inkubiert, anschließend gewaschen und für zwei Tage in Medium ohne Cytarabin kultiviert. Mit Hilfe eines Zytospins wurden die Zellen auf Objektträger zentrifugiert und gefärbt. (B) Quantifizierung der Morphologie. Die Zellen wurden ausgezählt und der prozentuale Anteil der unterschiedlich differenzierten Zellen aufgetragen. PMN = Polymorphonuklear; Mono = Monozyten; Makro = Makrophagen.

Die Ergebnisse dieses Kapitels belegen, dass onkogenes Ras in myeloischen Zellen Differenzierung induzieren kann, welche durch die Behandlung mit Cytarabin verstärkt werden kann.

4.7 Die Differenzierung ist abhängig von der Aktivierung der DNA-Schadenssignalkaskade

Die bisherigen Daten zeigen, dass Cytarabin die Differenzierung der *RAS*-infizierten Zellen induziert und dass die Aktivierung der DNA-Schadenssignalkaskade in diesen Zellen, insbesondere nach der Behandlung mit Chemotherapeutika, deutlich verstärkt ist. Basierend auf dieser Beobachtung wurde der Frage nachgegangen, ob die Cytarabin-induzierte Differenzierung in den *RAS*-infizierten Zellen von der Aktivierung der Kontrollproteine abhängig ist.

4.7.1 Koffein blockt die Cytarabin-induzierte Differenzierung

Koffein ist ein pflanzliches Alkaloid, das z.B. im Kaffeestrauch oder Matebaum vorkommt. Es gibt Hinweise darauf, dass Koffein Tumorzellen gegenüber ionisierender Strahlung (Gamma-Strahlung) sensibler macht. Untersuchungen an Koffein haben ergeben, dass es u.a. die katalytische Aktivität der ATM- und ATR-Kinasen inhibiert und dadurch die Signalkaskaden, die als Antwort auf DNA-Schaden aktiviert werden, abschwächt (Sarkaria, 1999 #33; Hall-Jackson, 1999 #34). IGR ist ein Alkaloid, das spezifisch die katalytische Aktivität der Kinase Chk1 inhibiert (Roberge, 1998 #45).

Um zu testen, ob die Cytarabin-induzierte Differenzierung von der Aktivierung der DNA-Schadenssignalkaskade abhängig ist, wurde eine FACS-Analyse auf den Differenzierungsmarker Gr1 nach Cytarabin-Behandlung in Anwesenheit von Koffein bzw. IGR durchgeführt. Dazu wurden 1×10^6 Kontroll-Zellen und *RAS*-infizierte Zellen ausgesät und mit 350 nM Cytarabin +/- 500 μ M Koffein bzw. 250 nM IGR für 24 Stunden behandelt. In einem Vorversuch konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Chk1 durch 0,5 mM Koffein blockiert wurde (**Abb. 33B**). Nach der Inkubation mit Cytarabin wurden die Zellen mehrmals gewaschen und in Medium ohne Cytarabin, aber mit Koffein bzw. IGR kultiviert. In 24 Stunden Intervallen wurden Zellen entnommen, gegen den Differenzierungsmarker Gr1 gefärbt und mit einem FACScalibur-Gerät analysiert. Für die Auswertung wurde die mittlere Fluoreszenz der Gr1-positiven Zellen (geometrisches Mittel) verwendet. Die Cytarabin-Behandlung induzierte in beiden Zelllinien Differenzierung (**Abb. 33A**). Die *RAS*-infizierten Zellen waren jedoch zwei Tage nach der Cytarabin-Behandlung stärker differenziert als die Kontroll-Zellen. Das geometrische Mittel der Gr1-positiven *RAS*-infizierten Zellen betrug zu diesem Zeitpunkt 5.500, im Vergleich zu einem geometrischen Mittel von 1.100 bei den Gr1-positiven Kontroll-Zellen. Die Differenzierung wurde durch die Behandlung mit Koffein gehemmt, nicht aber durch IGR. Bei den *RAS*-infizierten Zellen führte die Cytarabin-Behandlung somit zu einer verstärkten Differenzierung, die abhängig von der Aktivierung der ATM/ATR Kinasen war. Die Hemmung der Chk1 Kinase durch IGR reichte allein nicht aus, um die Differenzierung zu blockieren.

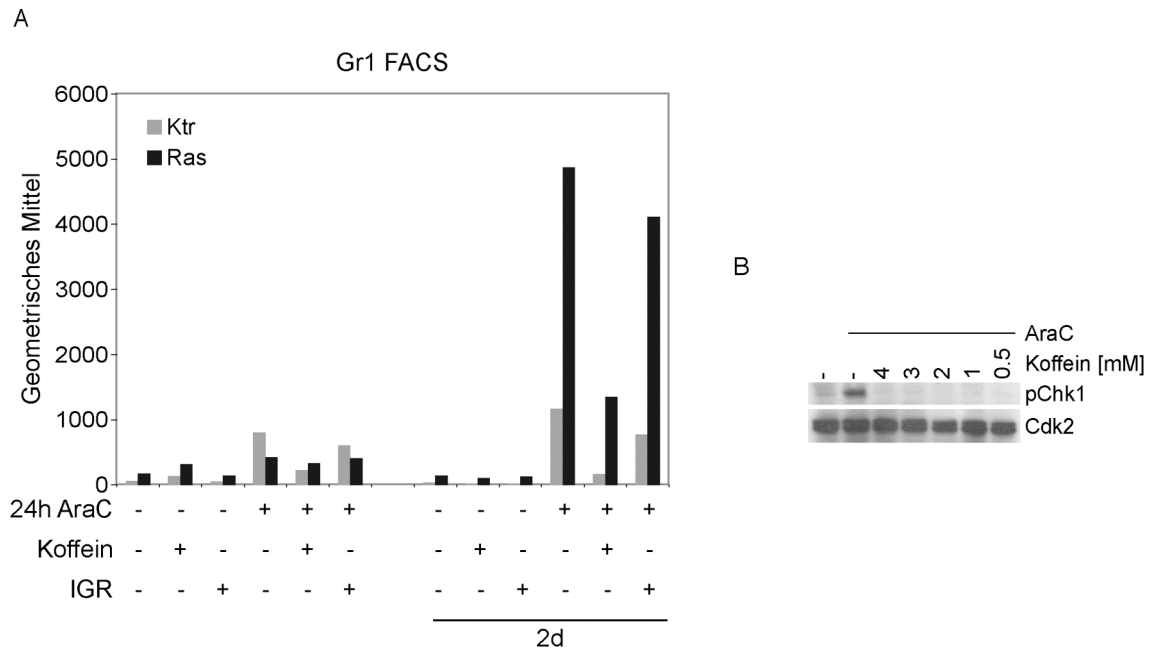


Abb. 33: Koffein blockt die Cytarabin-induzierte Differenzierung. (A) 1×10^6 Zellen wurden ausgesät und für 24 Stunden mit 350 nM Cytarabin +/- Koffein bzw. IGR behandelt. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und in Medium ohne Cytarabin aber in Anwesenheit von Koffein bzw. IGR weiter kultiviert. Zwei Tage später wurden die Zellen geerntet, mit PE-gekoppeltem Gr1 Antikörper gefärbt und mit dem FACScalibur analysiert. (B) Die Phosphorylierung von Chk1 wurde durch 0,5 mM Koffein blockiert. Für den Western-Blot wurden 1×10^6 RAS-infizierte Zellen ausgesät, 1 Stunde mit den angegebenen Koffein-Konzentrationen prä-inkubiert und anschließend mit 100 μ M Cytarabin behandelt. 50 μ g Gesamtzelllysate wurden geblottet. Cdk2 diente als Ladekontrolle.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass onkogenes Ras in den MLL-ENL-ER Zellen zum einen die DNA-Schadenssignalkaskade aktiviert und zum anderen Differenzierung induziert. Die Behandlung mit Cytarabin verstärkt die Aktivierung der DNA-Schadenssignalkaskade. Abhängig von dieser Aktivierung differenzieren die Zellen zu Granulozyten und Monozyten. Die differenzierten Zellen weisen kein klonogenes Potential mehr auf, so dass die Koloniebildung der RAS-infizierten Zellen nach der Behandlung mit Cytarabin, im Vergleich zu den Kontroll-Zellen, dezimiert ist.

5 Diskussion

Mutationen in einem der drei *RAS*-Gene treten in 30% aller akuten myeloischen Leukämien auf (Bos, 1989 #114). Die *CALGB* 8525 Studie (siehe Abschnitt 1.3) hat gezeigt, dass ein Zusammenhang zwischen *RAS*-Status, der in der Konsolidierungstherapie eingesetzten Cytarabin-Dosis und dem Rückfallrisiko besteht (Neubauer, 2008 #66). Patienten mit einer *RAS* Mutation entwickeln, unabhängig von ihrem zytogenetischen Hintergrund, signifikant weniger Rezidive als Patienten mit wildtyp *RAS*, wenn sie mit Hochdosis-Chemotherapie behandelt werden (Neubauer, 2008 #66).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Zellsystem etabliert, bei dem es sich um murine immortale hämatopoetische Zellen mit einem myeloischen Phänotyp handelt. Dieses Zellsystem wurde als Modell für die akute myeloische Leukämie verwendet, anhand dessen die biochemischen und zellbiologischen Effekte von Cytarabin auf Zellen mit wildtyp *RAS* und mutiertem *RAS* untersucht werden sollten. Es zeigt sich, dass onkogenes Ras die DNA-Schadensantwort auf die Behandlung mit Cytarabin verstärkt und davon abhängig die Differenzierung der Zellen aktiviert.

5.1 Die Klonogenität der *RAS*-infizierten Zellen ist nach Cytarabin-Behandlung beeinträchtigt

Klonogene Zellen sind Stamm- und Progenitorzellen, die sich in semisolidem Medium teilen und Kolonien aus genetisch identischen Tochterzellen bilden können. Innerhalb eines Tumors oder einer Leukämie ist nur ein kleiner Anteil der Zellen klonogen; die Masse der Tumorzellen können keine Kolonien bilden. Sowohl die Kontroll-Zellen als auch die *RAS*-infizierte Zellen enthalten klonogene Zellen, die in definierten Populationen angereichert werden können (**Abb. 14**). Die Klonogenität beider Zelllinien ist im unbehandelten Zustand vergleichbar (**Abb. 12, 13**) und beträgt im Durchschnitt für die Kontroll-Zellen 9% und für die *RAS*-infizierten Zellen 7% der Gesamtzellpopulation. Nach der Inkubation mit den Chemotherapeutika Cytarabin, Daunorubicin und Etoposid, Substanzen, die Anwendung in der Behandlung von akuten myeloischen Leukämien finden, ist die Koloniebildung bei den *RAS*-infizierten Zellen, im Vergleich zu den Kontroll-Zellen, signifikant reduziert (**Abb. 12, 13**). Die Elimination der *RAS*-infizierten Zellen ist dabei nicht auf eine verstärkte Replikation und damit erhöhte Empfindlichkeit der *RAS*-infizierten Zellen gegenüber Cytarabin zurückzuführen (**Abb. 11**). Eine ver-

stärkte Proliferation, wie sie für humane Knochenmarkzellen beobachtet wurde, nachdem sie mit mutiertem *RAS* infiziert worden sind (Maher, 1994 #79), ist in dem hier verwendeten System der *RAS*-infizierten MLL-ENL-ER Zellen nicht nachzuweisen.

Da die klonogenen Zellen weniger als 10% der Gesamtpopulation ausmachen, ist die Elimination dieser Zellen innerhalb der *RAS*-infizierten Zellen in Suspension nicht zu erkennen (**Abb. 10**). Dies deutet daraufhin, dass die verminderte Klonogenität der *RAS*-infizierten Zellen nach Chemotherapie-Behandlung auf eine kleine Population klonogener Zellen zurückzuführen ist, die in der Gesamtmasse der Zellen nicht sichtbar wird. Auch die Klonogenität der Kontroll-Zellen wird durch die Behandlung mit Cytarabin dezimiert. Jedoch ist der relative Effekt auf die klonogenen *RAS*-infizierten Zellen 5-fach stärker als auf die Kontroll-Zellen.

5.1.1 *RAS*-infizierte Zellen zeigen weniger Apoptose nach Cytarabin-Behandlung

Ist die eingeschränkte Klonogenität der *RAS*-infizierten Zellen nach Cytarabin-Behandlung auf die Induktion von Apoptose zurückzuführen? Die Induktion von Apoptose ist tatsächlich in den *RAS*-infizierten Zellen, im Vergleich zu den Kontroll-Zellen, niedriger (**Abb. 15, 16**). Diese Ergebnisse gehen mit Daten einher, die zeigen, dass *RAS*^{V12} in Neuronen des sympathischen Nervensystems, über den ERK/MAPK Signalweg, Cytarabin-induzierte Apoptose hemmt (Xue, 2000 #261). Bei der aktiven-Caspase 3 FACS-Analyse (**Abb. 16**) sind nach 20 Stunden Cytarabin-Behandlung 40% der Kontroll-Zellen Caspase 3 positiv während bei den *RAS*-infizierten Zellen nur 18% der Zellen aktive-Caspase 3 aufweisen. Im Gegensatz dazu zeigte die BrdU-PI FACS-Analyse (**Abb. 11**) keine Unterschiede in der Sub-G1 Phase der beiden Zelllinien. Der Unterschied zwischen diesen Ergebnissen könnte zum einen darin liegen, dass im Caspase-FACS nur ein definierter apoptotischer Marker gefärbt wird, während der Sub-G1 Bereich der BrdU-PI FACS alle Zellen enthält, die unter einer bestimmten Größe liegen und einen geringeren DNA Anteil aufweisen. Zum anderen zeigen *RAS*-infizierte Zellen nach einigen Passagen einen stärker differenzierten Phänotyp, als die Kontroll-Zellen (**Abb. 29, 30**), was die Apoptoserate beeinflussen könnte.

5.2 RAS-infizierte Zellen zeigen Merkmale von Seneszenz

Nach der Infektion der MLL-ENL-ER Zellen mit mutiertem *RAS* weisen die Zellen, im Vergleich zu den Kontroll-Zellen, Merkmale auf, die für seneszente Zellen beschrieben sind (siehe Einleitung 1.2.2). Die Expressionslevel der Proteine p53, p21^{Cip1}, p16^{Ink4a} und p19^{Arf} sind in den *RAS*-infizierten Zellen erhöht (**Abb. 19, 20**) und die Zellen zeigen eine stärkere Expression der Gene *ink4b* (p15^{Ink4b}) und *bhlhb2* (Dec1) (**Abb. 17**). Diese Ergebnisse entsprechen Daten, die aufweisen, dass die Überexpression von onkogenem Ras in primären Zellen einen seneszenten Phänotyp auslöst (Di Micco, 2006 #1; Bartkova, 2006 #2; Braig, 2005 #4; Malumbres, 2000 #8, Collado, 2006 #5).

Die Aktivität des Enzyms SA- β -Galaktosidase, vermutlich der verlässlichste Marker für Seneszenz (Dimri, 1995 #82), ist in den unbehandelten *RAS*-infizierten Zellen jedoch nicht stärker als in den Kontroll-Zellen, was zeigt, dass die Infektion mit mutiertem *RAS* allein in diesen Zellen keine Seneszenz hervorruft (**Abb. 18**). Die Aktivität des Enzyms wird jedoch durch die Behandlung mit Cytarabin induziert, wobei kein Unterschied zwischen Kontroll-Zellen und *RAS*-infizierten Zellen detektiert werden kann (**Abb. 18**). Auch die Expression der Gene *ink4b* und *bhlhb2* und der Proteine p53 und p21^{Cip1} wird durch Cytarabin verstärkt (**Abb. 17, 19, 20**) wobei die Expression in den *RAS*-infizierten Zellen höher ist als in den Kontroll-Zellen. Die stärkere Expression von *ink4b* in den unbehandelten *RAS*-infizierten Zellen ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass das Gen durch den RAF/MEK/ERK Signalweg induziert wird (Malumbres, 2000 #8) und die höheren Proteinlevel von p53 sind auf die erhöhte p19^{Arf} Expression durch Ras zurückzuführen (Palmero, 1998 #197; Bates, 1998 #196). Diese Ergebnisse zeigen, dass Cytarabin allein in den Zellen Seneszenz auslösen kann, auch wenn diese kein aktives Ras exprimieren (**Abb. 8**).

Die niedrige Expression des Tumorsuppressors p53 in den Zellen (**Abb. 19**) könnte damit zusammenhängen, dass MLL-ENL p53 hemmt, wobei die Daten aus der Literatur zeigen, dass nicht die Expression, sondern die Aktivierung des Proteins durch MLL-ENL blockiert wird. Dies wird dadurch erreicht, dass die Acetyltransferase p300 p53 nicht mehr binden und acetylieren kann (Wiederschain, 2005 #356). Dass aber auch in den Kontroll-Zellen der p53/p21^{Cip1} Signalweg funktional ist, zeigt die Induktion von p21^{Cip1} nach 24-stündiger Inkubation mit Cytarabin (**Abb. 20**).

Die stärkere Expression von p53 in den *RAS*-infizierten Zellen zeigt, dass Ras der Hemmung von p53 durch MLL-ENL entgegenwirkt. p53 ist in weniger als 10% der AML

mutiert. Dahingegen tragen jedoch ca. 30 der AML Mutationen in dem Phosphoprotein NPM1 (Renneville, 2008 #394). NPM1 reguliert die Stabilität und transkriptionelle Aktivität von p53 indem es mit Mdm2 interagiert und p53 vor proteasomalem Abbau schützt (Kurki, 2004 #410, Colombo, 2002 #409). NPM1 interagiert außerdem mit p19^{Arf} und verhindert dessen Degradation. In der mutierten NPM1 Form, ist das Protein nicht mehr im Nukleus lokalisiert sondern im Cytoplasma, die Interaktion mit p19^{Arf} liegt weiterhin vor, jedoch schützt NPM1 p19^{Arf} nicht mehr vor dem Abbau durch das Proteasom. Die Folge ist, dass die p19^{Arf} Level in der Zelle niedrig sind, was zum Abbau von p53 führt (Colombo, 2006 #411). In diesen AMLs, in denen p53 in seiner wildtyp Form vorliegt, jedoch die Stabilisierung oder Aktivierung beeinträchtigt ist, könnte die Überexpression von onkogenem *RAS* die Hemmung von p53 überkommen, so dass dieser Effekt von *RAS* somit nicht nur spezifisch für MLL-ENL tragende AMLs ist.

Der Grund für die verstärkte Expression von p21^{Cip1} in den *RAS*-infizierten Zellen nach Cytarabin-Behandlung liegt in der p53-abhängigen Aktivierung des *cdkn1a* Genlocus. Nach Schädigung der DNA durch Cytarabin wird p53 induziert (**Abb. 19**), wodurch es zur Zunahme der Expression von p21^{Cip1} kommt. Im Rahmen einer Diplomarbeit (Daniela Rübsamen), in der untersucht wurde, ob der Effekt von *RAS* von dem p16^{Ink4a}/pRB oder dem p21^{Cip1}/p53 Signalweg abhängig ist, konnte gezeigt werden, dass die p21^{Cip1} Expression durch ein dominant negatives p53 Konstrukt vollständig blockiert wird.

Die Expression der Zellzyklusinhibitoren p16^{Ink4a} und p19^{Arf} ist in den *RAS*-infizierten Zellen höher als in den Kontroll-Zellen (**Abb. 20**). Dies könnte an der Aktivierung der Expression dieser Proteine durch den Ras/MEK/ERK Signalweg liegen. Für p16^{Ink4a} ist gezeigt worden, dass die Aktivierung über die Transkriptionsfaktoren Ets1 und Ets2 erfolgt (Ohtani, 2001 #191) und für p19^{Arf} über die Expression des Transkriptionsfaktor Dmp1 (Sreeramaneni, 2005 #412).

5.2.1 Onkogenes *RAS* verstärkt die DNA-Schadenssignalkaskade

Die Infektion primärer Zellen mit einem Onkogen veranlasst die Zelle zur Hyperreplikation, wodurch DNA-Schäden entstehen, die die Aktivierung der DNA-

Schadenssignalkaskade, gefolgt von einem seneszenten Phänotyp, nach sich zieht (Mallette, 2007 #204; Di Micco, 2006 #1; Bartkova, 2006 #2).

Mit diesen Daten einhergehend, zeigen unsere *RAS*-infizierten Zellen im Vergleich zu Kontroll-Zellen eine Phosphorylierung von H2A.x und Chk1 im unbehandelten Zustand (**Abb. 24, 25**). Dies könnte durch eine Hyperreplikation der *RAS*-infizierten Zellen verursacht sein und würde mit der Beobachtung korrelieren, dass die Zellen direkt nach der Infektion mit onkogenem *RAS* schneller proliferieren als Zellen mit wildtyp *RAS*, und die Aktivierung der DNA-Schadenssignalkaskade erst drei bis vier Wochen nach der Infektion zu detektieren ist (Daten nicht gezeigt).

Die Behandlung mit Cytarabin, Daunorubicin und Etoposid führt in Abhängigkeit von der Konzentration dieser Substanzen zur Phosphorylierung von Chk1 in beiden Zelllinien (**Abb. 22, 26**), was zeigt, dass der DNA-Schadenssignalweg auch in den Kontroll-Zellen funktional ist und durch onkogenes *RAS* verstärkt wird. Die Aktivierung von Chk1 ist nur transient (**Abb. 21**), weil die Phosphorylierung von Chk1 an Serin 345 das Protein gleichzeitig zur Degradation durch das Proteasom markiert (Zhang, 2005 #10).

Die Aktivierung der Kinase Chk2 ist unabhängig vom Zellzyklus und erfolgt in proliferierenden Zellen wie auch in quieszenten oder differenzierten Zellen (Lukas, 2001 #172). Hieraus ergibt sich die Frage, welchen Einfluss die Differenzierung auf die Aktivierung von Chk1 in den MLL-ENL Zellen hat. Differenzierte Kontroll-Zellen zeigen keine Phosphorylierung von Chk1 nach Cytarabin-Behandlung, wohingegen *RAS*-infizierte Zellen eine Aktivierung von Chk1 im unbehandelten Zustand aufweisen, die auch nach Cytarabin-Behandlung weiter verstärkt wird (**Abb. 27 A**). Dieses Ergebnis, dass Zellen, die sich nicht mehr teilen, die DNA-Schadenssignalkaskade aktivieren, steht im Gegensatz zu Beobachtungen, die im Rahmen der onkogen-induzierten Seneszenz gemacht wurden. Dort konnte keine Aktivierung der DNA-Schadenssignalkaskade in der Abwesenheit von DNA-Replikation detektiert werden (Di Micco, 2006 #1).

Diese gegensätzlichen Beobachtungen könnten auf die unterschiedlichen Zellsysteme zurückzuführen sein: Onkogen-induzierte Seneszenz wurde in humanen Fibroblastenzellen, die mit dem Enzym h-Tert immortalisiert worden waren untersucht, während es sich bei den hier verwendeten Zellen um murine MLL-ENL-transformierte hämatopoetische Zellen handelt. Das Ergebnis zeigt, dass onkogenes *RAS* in diesem Zellsystem eine direkte Aktivierung von Chk1 vermitteln kann, die unabhängig von der Zellteilung ist.

Aus dem Vergleich zwischen differenzierten und undifferenzierten *RAS*-infizierten Zellen geht hervor, dass die Phosphorylierung von Chk1 in Zellen mit MLL-ENL-ER Expression schwächer ist (**Abb. 27 B**). Dieses Ergebnis könnte darauf hin weisen, dass MLL-ENL die Phosphorylierung von Chk1 hemmt.

Es könnte sein, dass die Blockade der DNA-Schadensantwort einer der Mechanismen für die MLL-ENL induzierte Transformation ist. Zumindest wurde für Schilddrüsentumoren mit onkogenem Ras die Aktivierung der DNA-Schadenssignalkaskade beobachtet, wobei eine Subpopulation der Zellen der Apoptose-Induktion durch die Signalkaskade entging. Genau diese Zellen zeigten Merkmale eines transformierten Phänotyps und genetische Instabilität. Einige Proteine der DNA-Schadenssignalkaskade waren in den Zellen weiterhin aktiviert, führten aber nicht mehr zu phosphoryliertem H2A.x oder zur vollen Aktivierung von p53. Infolgedessen trug der Abbruch der DNA-Schadensantwort zur Ras-induzierten Transformation bei (Abulaiti, 2006 #359). Die für die Zelle sichtbare Folge der Expression des onkogenen *RAS* hängt also u.a. vom verwendeten Zelltyp ab.

5.3 *RAS*^{V12} induziert myeloische Differenzierung, die durch Cytarabin verstärkt wird

Eine Möglichkeit, weshalb *RAS*-infizierte Zellen nach Chemotherapie-Behandlung eine eingeschränkte Klonogenität aufweisen, könnte darin bestehen, dass die Zellen in Differenzierung gehen. Differenzierte Zellen sind nicht in der Lage, Kolonien in Methylzellulose zu bilden (**Abb. 14**). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Expression der Differenzierungsmarker *ly6g* (Gr1) und *itgam* (Mac1), Membranproteine, die an der Oberfläche von differenzierten myeloischen Zellen lokalisiert sind, in *RAS*-infizierten Zellen höher ist als in Kontroll-Zellen (**Abb. 29, 30**). Gleichzeitig ist die Expression des Stammzellmarkers c-kit in den *RAS*-infizierten Zellen stark herunterreguliert (**Abb. 31**). Durch die Behandlung mit Cytarabin wird die Expression der Differenzierungsmarker weiter verstärkt, was deutlicher in den *RAS*-infizierten Zellen auftritt als in den Kontroll-Zellen, während die des Stammzellmarkers in den *RAS*-infizierten Zellen weiter abnimmt. Dabei vermittelt Ras die Aktivierung der Differenzierung nicht durch die Hemmung von MLL-ENL-ER oder die Repression von MLL-ENL-ER Zielgenen (**Abb. 9**).

Die verstärkte Differenzierung der *RAS*-infizierten Zellen passt gut zu Beobachtungen, die zeigen, dass onkogenes Ras in hämatopoetischen Zellen Differenzierung auslösen kann (Hawley, 1995 #119; Hibi, 1993 #32; Shen, 2007 #121).

Die Induktion der Differenzierung ist auf Transkriptionsfaktoren zurückzuführen, die durch den Ras Signalweg aktiviert werden. Einer der Transkriptionsfaktoren ist PU.1. Er gehört zu der Familie der Ets-Transkriptionsfaktoren (Wasylyk, 1994 #364) und ist für die Entwicklung von Monozyten essentiell, da PU.1 die Expression eines monozyten-spezifischen Rezeptors (M-CSF) stimuliert (siehe Einleitung 1.2.4). Dieser Rezeptor ist für das Überleben, die Proliferation und die Differenzierung dieser Zellen entscheidend. Die Induktion des Rezeptors ist außerdem abhängig vom Transkriptionsfaktor c-Jun, dessen Expression durch die Ras/RAF/MEK/ERK Signalkaskade induziert wird. c-Jun bindet an die Ets-Domäne von PU.1 und verstärkt die Transaktivierung am Promotor des Rezeptors (Behre, 1999 #363).

Ein weiterer Transkriptionsfaktor ist C/EBP α . Dieser induziert die Expression des G-CSF Rezeptors, der die Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen zu Granulozyten reguliert. Die Ras-induzierte Signalkaskade und C/EBP α zeigen eine direkte Interaktion, denn Ras aktiviert die Proteinkinase C, die daraufhin C/EBP α an Serin 248 phosphoryliert. Der Promotor des G-CSF Rezeptors enthält eine C/EBP α Bindungsstelle, so dass nach der Phosphorylierung von Serin 248, welches in der Transaktivierungsdomäne von C/EBP α liegt, die Expression des G-CSF Rezeptor aktiviert wird. Dies löst die Differenzierung in Granulozyten aus (Behre, 2002 #22; DiPearn, 2007 #29). Die Induktion der Differenzierung in den *RAS*-infizierten Zellen ist vermutlich auf eine Aktivierung dieser Transkriptionsfaktoren zurückzuführen.

Die Behandlung mit Cytarabin bewirkt eine Verstärkung der Differenzierung, so dass die Expression der Differenzierungsmarker in den *RAS*-infizierten Zellen nach der Behandlung deutlich höher ist als in den Kontroll-Zellen (**Abb. 29, 30**). Auch morphologisch lässt sich dies gut anhand der Pappenheim-Färbung erkennen (**Abb. 32 A**). Die Cytarabin-behandelten *RAS*-infizierten Zellen weisen die geringste Anzahl an unreifen Blasten und Promyelozyten auf, die Gesamtzellpopulation besteht hauptsächlich aus differenzierten stab- und polymorphkernigen Granulozyten bzw. reifen Monozyten/Makrophagen (**Abb. 32 B**).

Dies geht mit Daten aus der Literatur einher, die beschreiben, dass Cytarabin in hämatopoetischen Zellen Differenzierung auslöst (Takagaki, 2005 #9; Huang, 1988 #91; Nagler, 1986 #92).

Mit den in dieser Arbeit verwendeten MLL-ENL Zellen wird hier gezeigt, dass durch die Expression von onkogenem *RAS* auch in Leukämiezellen Differenzierung induziert werden kann, wenn diese mit Cytarabin behandelt werden. Dies legt nahe, dass der Effekt von Cytarabin und onkogenem *RAS* zusammen eine additive Wirkung hinsichtlich Differenzierung aufweist.

Der genaue Mechanismus, durch den Cytarabin die Differenzierung induziert, ist nicht bekannt, jedoch ist gezeigt worden, dass die Expression von p21^{Cip1} dafür essentiell ist (Wang, 2000 #390). p21^{Cip1} inhibiert Zellproliferation und induziert Differenzierung (Missero, 1996 #187; Asada, 1998 #388; Shen, 2007 #121). So ist vermutlich auch die Differenzierung der *RAS*-infizierten Zellen nach der Behandlung mit Cytarabin durch die verstärkte Expression von p21^{Cip1} vermittelt (**Abb. 20**).

Interessanterweise ist der Zellzyklusinhibitor p15^{Ink4b} nicht nur in seneszenten Zellen hochreguliert. Es gibt Daten, die zeigen, dass die Expression dieses Proteins, wie auch des Zellzyklusinhibitors p16^{Ink4a}, während der Differenzierung von hämatopoetischen und neuronalen Zellen induziert wird (Lois, 1995 #350; Teofili, 2000 #351; Schmidt, 2001 #352). Ähnliches ist auch für den Transkriptionsfaktor Dec1 beschrieben, der die Differenzierung von Knorpelzellen fördert (Shen, 2002 #353). Das Gen, welches für das Protein Dec1 kodiert, ist ein p53 Zielgen und wird nach DNA-Schädigung induziert. Dec1 vermittelt Zellzyklusarrest und hemmt ID1 (*Inhibitor of Differentiation*), ein Onkogen, das in vielen Tumoren hochreguliert ist (Qian, 2008 #354). Somit könnte die stärkere Expression der beiden Seneszenzmarker p15^{Ink4b} und Dec1 (**Abb. 17**) in den *RAS*-infizierten Zellen auf einen differenzierten Phänotyp zurückzuführen sein.

5.3.1 Die Aktivierung von ATM/R ist notwendig für die myeloische Differenzierung

Die bisherigen Ergebnisse weisen zwei Merkmale *RAS*-infizierter Zellen auf. Die DNA-Schadensantwort ist im unbehandelten Zustand und nach Behandlung mit diversen Chemotherapeutika, im Vergleich zu Kontroll-Zellen, verstärkt, und die Zellen differenzieren nach Cytarabin-Behandlung deutlich stärker als die Kontrollzellen aus. Damit

ergibt sich die Frage, ob die Aktivierung der DNA-Schadenssignalkaskade für die Differenzierung notwendig ist.

Die zusätzliche Behandlung der Zellen mit dem ATM/ATR Inhibitor Koffein zeigt, dass die Differenzierung der *RAS*-infizierten Zellen nach Cytarabin-Behandlung von der DNA-Schadensantwort abhängig ist (**Abb. 33**). Dieses Ergebnis bestätigt Daten, die zeigen, dass die Behandlung hämatopoetischer Zellen mit Koffein den Cytarabin-induzierten Arrest in der S-Phase verhindert (Sugimoto, 2000 #349), was darauf hindeutet, dass Cytarabin diesen Arrest über die Aktivierung der ATM/ATR-Kinasen vermittelt. Zudem aktiviert Cytarabin die Differenzierung der humanen Leukämiezelllinie K562, und dieser Vorgang wird durch Koffein blockiert (Takagaki et al. 2005 #9). Das Ergebnis, dass die Differenzierung von der DNA-Schadensantwort abhängig ist, passt gut zu Daten, die zeigen, dass die Onkogen-induzierte Seneszenz kausal mit der DNA-Schadensantwort verbunden ist. Wird die DNA-Schadensantwort gehemmt, kommt es nicht zur Seneszenz, sondern zur Transformation der Zellen (Di Micco, 2006 #1).

Die Inhibition der Chk1 Kinase durch den spezifischen Inhibitor IGR war nach unseren Untersuchungen nicht ausreichend, um die Differenzierung der *RAS*-infizierten Zellen zu blockieren (Daten nicht gezeigt). Die Ursache dafür könnte darin liegen, dass die Differenzierung bereits durch die Kinase ATR angeschaltet wird. Neben der Aktivierung von Chk1 phosphoryliert ATR auch den Tumorsuppressor p53 (Tibbetts, 1999 #50; Lakin, 1999 #51). Dass die Cytarabin-induzierte Differenzierung von der Aktivierung des p53 Signalweges abhängig ist, wurde von Daniela Rübsamen im Rahmen ihrer Diplomarbeit in unserer Gruppe belegt: Die Stabilisierung von p53 durch den Mdm2-Antagonisten Nutlin-3 verstärkt die Differenzierung dieser Zellen, wohingegen die Hemmung des p53 Proteins durch ein dominant negatives p53-Oligopeptid die myeloische Differenzierung vollständig blockiert. Demzufolge ist vermutlich die Aktivierung von p53 durch die ATR Kinase für die Differenzierung der *RAS*-infizierten Zellen ausreichend, so dass die alleinige Hemmung von Chk1 keinen Effekt zeigt.

Die eingeschränkte Klonogenität *RAS*-infizierter Zellen nach Chemotherapie-Behandlung (**Abb. 12, 13**) korreliert mit der verstärkten Aktivierung der DNA-Schadenssignalkaskade durch die Zytostatika (**Abb. 22, 26**). Zudem hat die Untersuchung von Cytarabin ergeben, dass die Aktivierung der DNA-Schadenssignalkaskade kausal mit der Differenzierung der Zellen in Verbindung steht (**Abb. 33**). Daraus lässt

sich ableiten, dass klonogene Zellen innerhalb der heterogenen Gruppe *RAS*-infizierter Zellen nach der Behandlung mit Chemotherapeutika durch Differenzierung eliminiert werden. Dabei wird die DNA-Schadensantwort durch onkogenes Ras direkt verstärkt, was die Aktivierung von p53 zur Folge hat. p53 induziert die Expression von p21^{Cip1}, wodurch möglicherweise die Differenzierung der Zellen vermittelt wird (s.o.).

Die Ergebnisse dieser Arbeit befinden sich im Einklang mit den weiter oben zitierten Daten der CALGB 8525 Studie (Neubauer, 2008 #66). So zeigen *RAS*-infizierte Zellen keine Unterschiede zu Kontroll-Zellen hinsichtlich Apoptose und Zellüberleben nach der Behandlung mit Cytarabin. Dies korreliert mit der klinischen Situation, denn Patienten mit wildtyp *RAS* und mutiertem *RAS* weisen keinen Unterschied hinsichtlich der Induktions-Therapie und das Erreichen einer kompletten Remission auf. Erst nachfolgend zeigt sich bei Patienten mit mutiertem *RAS* eine signifikant reduzierte Rückfallrate. Dies korreliert mit der eingeschränkten Klonogenität der *RAS*-infizierten Zellen nach der Cytarabin-Behandlung. Denn es gibt Hinweise darauf, dass die Bildung eines Rezidivs von diesen klonogenen Zellen, die in der AML als Leukämie-initiierende Zellen oder Tumorstammzellen bezeichnet werden, abhängig ist. Zellen, die sich wie Tumorstammzellen verhalten, wurden bis heute bei verschiedenen hämatologischen Erkrankungen und soliden Tumoren gefunden. Die AML war die erste Krebserkrankung, bei der diese Zellen identifiziert wurden (Zitat Lapidot et al., Nature 1994).

Die Theorie über Tumorstammzellen ist aus Transplantationsexperimenten entstanden. Diese zeigen, dass isolierte und aufgereinigte Blasten-Zellen eines AML Patienten eine Leukämie reproduzieren, wenn diese in immundefiziente Mäuse (NOD/SCID Mäuse) gespritzt werden, die dem gleichen Phänotyp der ursprünglichen Erkrankung entspricht (Lapidot, 1994 #413; Huntly, 2005 #373). Außerdem zeigen die Zellen die Fähigkeit, in semisolidem Medium wie Softagar oder Methylzellulose zu wachsen. Da die Anzahl der Tumorzellen, die injiziert werden muss, um in Empfänger-mäusen Tumoren zu erzeugen, sehr hoch ist (bis zu 1×10^6 Zellen), ist daraus die Theorie entstanden, dass es innerhalb der Tumorzellen eine Hierarchie gibt, in der nur eine kleine Anzahl von Zellen ein Tumor-initiierendes Potential innehaben. Dies bedeutet, dass die Tumorzellen funktionell heterogen sind und nur eine relativ geringe Anzahl von Zellen die Fähigkeit besitzt, einen Tumor zu rekonstruieren.

Wieso geht man davon aus, dass es sich bei diesen Zellen um Stammzellen handelt? Die immunphänotypische Charakterisierung von humanen hämatopoetischen Stamm-

zellen ($CD34^+/CD38^-$) ermöglicht es, diese Zellen anzureichern. Transplantationsexperimente zeigen, dass der Transfer von humanen AML-Zellen in Empfängermause von dieser Subpopulation $CD34^+/CD38^-$ -Zellen abhängig ist (Lapidot, 1994 #413). Diese Ergebnisse machen deutlich, dass tatsächlich Stammzellen, für die Repopulation eines Tumors verantwortlich sind und legen nahe, dass die Bildung von Rezidiven von diesen Zellen ausgeht.

Die Tumor-initiiierenden Zellen tragen nicht nur Stammzellmarker, sie weisen zudem Eigenschaften von Stammzellen auf, d.h. sie verfügen über das Potential des *long-term self renewal* und sind multipotent, können sich also in alle Zelltypen, die innerhalb eines Tumors vorliegen, entwickeln (Pardal, 2003 #414). Die Tumorstammzellen üben damit die Funktion aus, das Wachstum und die Ausbreitung des Tumors aufrechtzuerhalten und die verschiedenen Zelltypen des Tumors immer wieder neu zu bilden.

Dies bringt die Tumorstammzellen in einen therapeutischen Zusammenhang. Nach der Tumorstammzelltheorie hängt der Erfolg einer Therapie von dem Effekt ab, den die Behandlung auf die Tumorstammzellen hat. So könnten z.B. Therapeutika, die die Tumorstammzellen gegenüber apoptotischen Stimuli sensibilisieren oder die Differenzierung dieser Zellen aktivieren, die Rate der Rückfallerkrankungen reduzieren.

Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse lassen vermuten, dass Chemotherapeutika wie Cytarabin die Tumorstammzellen unter bestimmten Bedingungen (RAS^{V12}) zur Differenzierung veranlassen können. Der Effekt von onkogenem RAS ist dabei vermutlich auf die Aktivierung von p53 zurückzuführen, die die Zellen dazu veranlasst, in der Differenzierungslinie weiter fortzuschreiten. Die zusätzliche Behandlung mit Cytarabin verstärkt die Aktivierung von p53, so dass die Zellen zu reifen Granulozyten und Monozyten/Makrophagen ausdifferenzieren (**Abb. 34**).

In Bezug auf die Therapie der AML gibt diese Arbeit einen Hinweis darauf, dass AML-Patienten möglicherweise durch eine Behandlung mit Nutlin-3, welches zu einer Aktivierung von p53 führt, profitieren, da die Differenzierung Leukämie-initiiierender Zellen eingeleitet werden könnte. Unsere Ergebnisse zeigen auch, dass Differenzierung als ein Sicherheitsmechanismus gegen Tumorgenese und Resistenz bei Leukämien, deren Zellen einen funktionalen p53/p21^{Cip1} Signalweg aufweisen, darstellen kann.

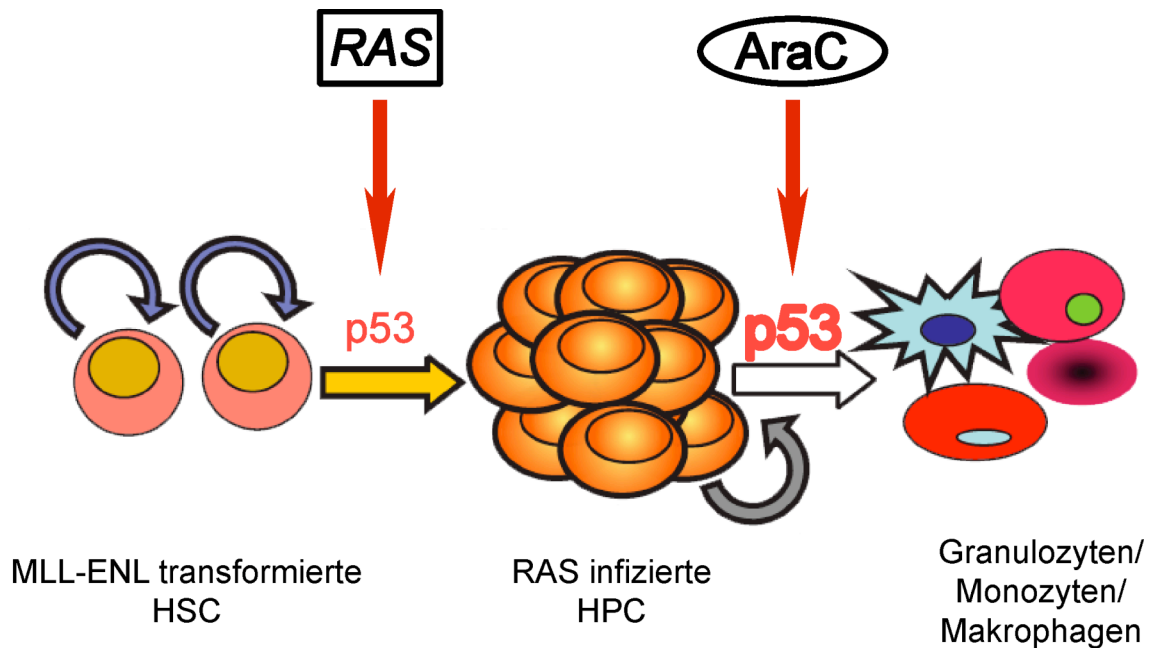


Abb. 34: Schematische Darstellung der RAS- und Cytarabin-induzierte Differenzierung von MLL-ENL-transformierten HSC (modifiziert nach Essers et al., 2009). Durch die Infektion der MLL-ENL transformierten hämatopoetischen Stammzellen (HSC) mit onkogenem RAS wird der Tumorsuppressor p53 aktiviert. Dies führt zu einem stärker differenzierten Phänotyp der Zellen (Hämatopoetische Progenitor Zellen, HPC). Die Behandlung mit Cytarabin verstärkt die p53-Aktivierung, woraufhin die Zellen zu reifen Granulozyten und Monozyten/Makrophagen differenzieren.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass onkogenes Ras in hämatopoetischen Zellen die DNA-Schadensantwort auf diverse Chemotherapeutika verstärkt, und davon abhängig die Differenzierung der Zellen aktiviert. Davon sind potentiell Tumorstammzellen betroffen, so dass die Aktivierung von Differenzierung als weiterer Sicherheitsmechanismus, neben Seneszenz und Apoptose, im Zusammenhang mit Tumorgenese definiert werden kann.

Ausblick

Eine anhand der multizentrischen *CALGB* Studie 8525 durchgeführte retrospektive Analyse hat verdeutlicht, dass mutiertes, onkogenes *RAS* in Tumorzellen positive Auswirkungen auf die Behandlung mit Chemotherapeutika haben kann. In dem Zellsystem, welches in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, führte die Expression von onkogenem *RAS* zu einer verstärkten DNA-Schadensignalkaskade, wodurch Differenzierung ausgelöst wurde, die das klonogene Potential der Gesamtzellpopulation dezimierte. Bisher ging das Verständnis über die Wirkung von Chemotherapeutika nicht über Hemmung der Replikation und Induktion von Apoptose hinaus. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass konventionelle Zytostatika einen weiteren Mechanismus zur Tumorbekämpfung aktivieren können: Differenzierung. Für das hämatopoetische System ist dies ein attraktiver therapeutischer Ansatz, da die Lebensdauer der reifen Zellen kurz ist, was die Wahrscheinlichkeit von sekundären Mutationen, die zu einer erneuten Transformation der Zellen führen könnten, mindert. Dabei ist von besonderem Interesse, dass davon auch potentiell Tumorstammzellen betroffen sein könnten. Differenzierung als therapeutischer Ansatz findet bereits in der Behandlung der akuten Promyelozyten Leukämie Anwendung. Die Kombination von konventioneller Chemotherapie zusammen mit Retinolsäure übergeht hier den Differenzierungsblock durch PML-RAR α .

Für die Entwicklung von Substanzen, die die Differenzierung aktivieren, müssen jedoch zunächst die Mechanismen aufgeklärt werden, die diesen Prozess in Gang setzen. Bezogen auf die Ergebnisse dieser Arbeit würde das bedeuten herauszufinden, wie onkogenes Ras die DNA-Schadensantwort verstärkt, und welche darauf folgenden Signalwege für die Differenzierung entscheidend sind. Die Identifizierung des p53 Signalweges als Vermittler der Cytarabin- und Ras-induzierten Differenzierung hat in diesem Zellsystem ermöglicht, die Differenzierung der Zellen durch eine Kombination aus Cytarabin und Nutlin-3, einem Inhibitor von Mdm2, herbeizuführen.

Diese Beobachtung ist von besonderem Interesse in Bezug auf einen therapeutischen Ansatz. Die chemotherapeutische Behandlung der AML führt nur bei einem Teil der Patienten zu einer Heilung der Erkrankung. Ein wesentliches Problem ist die hohe Rate an Rückfällen. Diese gehen vermutlich von Leukämie-initiierenden Zellen aus. Die Hypothese dieser Tumorstammzellen postuliert, dass nur eine kleine Population von Zellen innerhalb des Tumors über uneingeschränktes Selbsterneuerungspotential ver-

fügt und diese Zellen oftmals durch herkömmliche Chemotherapeutika nicht eliminiert werden, da sie Transporter exprimieren, die die Zytostatika mit großer Effizienz aus der Zelle befördern und zudem ihre Teilungsrate sehr langsam ist. Folglich kann sich der Tumor bzw. die Leukämie nach Beendigung der Chemotherapie erneut entwickeln (Bonnet, 1997 #372; Huntly, 2005 #373, Zhao, 2009 #371, Donnenberg, 2005 #374).

Die Ergebnisse dieser Arbeit, zusammen mit der Beobachtung, dass die Differenzierung durch den p53 Signalweg vermittelt wird, führen zu der Hypothese, dass die Induktion der Differenzierung dieser Leukämie-initiierenden Zellen durch eine Kombinationstherapie aus Cytarabin und Nutlin-3 induziert werden kann. Dies würde den Erfolg der Therapie verbessern, denn die Behandlung mit Cytarabin allein eliminiert zwar die Masse der Tumorzellen, jedoch sind davon wahrscheinlich nicht oder nur zu einem Teil die Tumorstammzellen betroffen. Die Differenzierung und damit Beseitigung dieser Zellen könnte aber durch die Stabilisierung und Aktivierung von p53 herbeigeführt werden. Eine alleinige Therapie mit Nutlin-3 könnte zwar zu einer Differenzierung der Tumorzellen führen, würde jedoch für eine umgehende Regression der Masse der Zellen nicht ausreichen. Eine Kombination aus Cytarabin und Nutlin-3 würde hingegen die Masse der Tumorzellen reduzieren und gleichzeitig die Differenzierung der Tumorstammzellen aktivieren, was die Tumor Rückbildung zur Folge hätte (**Abb. 35**).

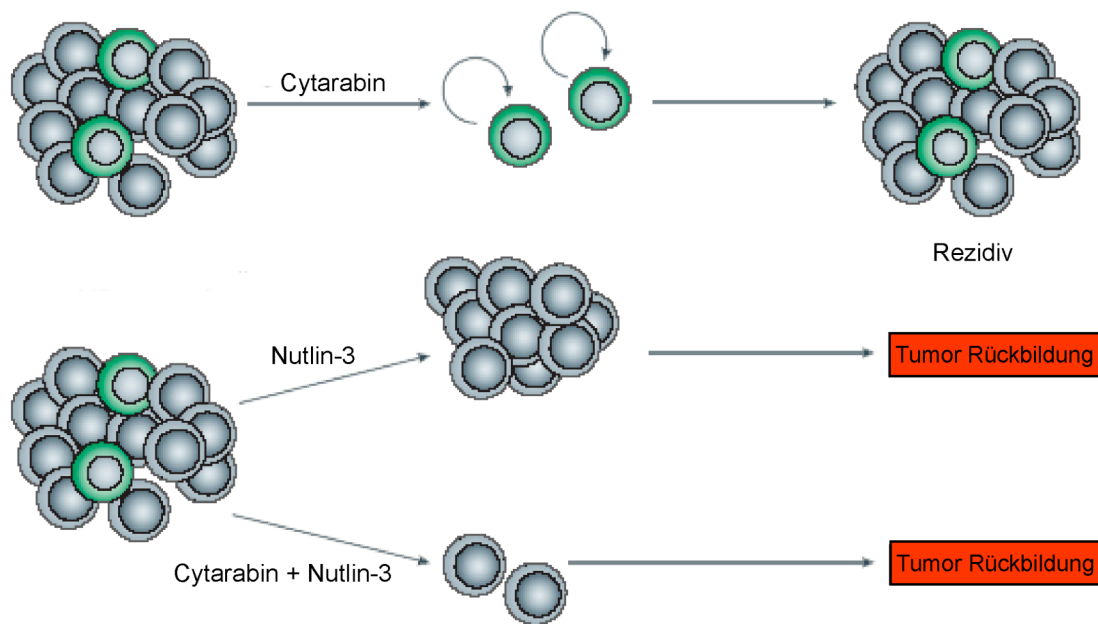


Abb. 35: Hypothese der Therapie von leukämischen Stammzellen (modifiziert nach: James E. Kennedy, 2005). Die Behandlung von Leukämien verwendet gegenwärtig Chemotherapeutika, die insbesondere proliferierende Tumorzellen (blau) eliminieren. Die Leukämie initiiierenden Zellen (Tumorstammzellen, grün) sind davon wahrscheinlich nicht betroffen, so dass es nach der Therapie zu Rückfallerkrankungen kommt. Die Differenzierung der Tumorstammzellen wird durch die Aktivierung von p53 induziert, was durch den Mdm2-Inhibitor Nutlin-3 bewirkt wird. Die Kombinationstherapie aus Cytarabin und Nutlin-3 könnte zur Elimination der Tumorzellen einschließlich der Tumorstammzellen führen, wodurch eine Remission erzielt werden könnte.

Nach dieser Hypothese würden AML Patienten mit wildtyp p53 von einer Kombinations-Therapie aus Cytarabin und Nutlin-3 profitieren. Die Entwicklung von Substanzen, die die Differenzierung p53 mutierten Zellen aktivieren, ist ein weiterer wichtiger Schritt, der Resistenz vieler Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika entgegenzuwirken.

Grundlage für diese Arbeit war das Zusammenwirken von klinischer und experimenteller Wissenschaft (Translationale Forschung). Die klinische Beobachtung an AML-Patienten konnte in der experimentellen Forschung verifiziert und die molekularen Vorgänge aufgeklärt werden. Durch die Erforschung, was leukämische Zellen beeinflusst und wie sie auf Zytostatika reagieren, konnten neue Erkenntnisse gewonnen werden, die die Entwicklung neuer Therapiestrategien nach sich ziehen. Diese Arbeit zeigt, dass durch die Translationale Forschung Krebstherapie zu einem zielgerichteten Prozess wird.

6 Zusammenfassung

6.1 Deutsche Zusammenfassung

Ras-Proteine gehören zu einer Familie von Proto-Onkogenen, die für kleine GTPasen kodieren. Sie sind an vielen zellulären Prozessen wie Zellteilung, Apoptose und Differenzierung beteiligt. In 20-30% aller menschlichen Tumore weisen die *RAS*-Gene Punktmutationen auf, die das Protein in einen konstitutiv aktiven Zustand versetzen. Aus einer retrospektiven Studie von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (CALGB 8525) ist hervorgegangen, dass es eine Korrelation zwischen *RAS*-Status und Rezidivrate nach hochdosierter Cytarabin-Behandlung gibt. Patienten mit mutiertem *RAS* und Hochdosis-Cytarabin Behandlung, entwickelten signifikant weniger häufig Rezidive als Patienten mit wildtyp *RAS* oder Patienten, die mit Niedrigdosis-Cytarabin behandelt wurden. Somit geht aus der Studie hervor, dass die Expression eines Onkogens in Tumorzellen positive Auswirkungen auf die Behandlung mit Chemotherapeutika haben kann. Ausgehend von dieser Beobachtung sollte in dieser Arbeit der Effekt von onkogenem *RAS* in einem Zellsystem *in vitro* studiert und die molekularen Mechanismen aufgeklärt werden. Um onkogenes Ras in einem Zellsystem zu untersuchen, das als Model für akute myeloische Leukämie herangezogen werden kann, wurden hämatopoetische Zellen der Maus, die mit dem onkogenen Fusionsprotein MLL-ENL immortalisiert wurden, verwendet. Das Fusionsonkoprotein MLL-ENL kommt ausschließlich in Leukämien vor und die Zellen zeigen einen myeloischen Phänotyp. Diese Zellen wurden mit einem Kontrollvektor bzw. mit einem Vektor, der onkogenes *RAS*^{V12} exprimiert, infiziert und auf die Behandlung mit Chemotherapeutika, insbesondere Cytarabin, untersucht. Die zytotoxische Wirkung von Cytarabin beruht darauf, dass die Substanz das Fortschreiten der Replikationsgabel behindert, woraufhin eine DNA-Schadenssignalkaskade aktiviert wird, die nachfolgend Zellzyklusarrest oder Apoptose vermittelt. Cytarabin wirkt somit hauptsächlich auf Zellen, die sich in der Replikationsphase befinden. In Suspension wiesen die *RAS*-infizierten Zellen auf die Behandlung mit Cytarabin keinen Unterschied zu den Kontroll-Zellen hinsichtlich Zellzahl, Zellzyklus und Apoptose auf. Erfolgte die Kultivierung jedoch in semisolidem Medium, um die Klonogenität der Zellen zu untersuchen, zeigten die *RAS*-infizierten Zellen nach der Behandlung mit Cytarabin, Etoposid und Daunorubicin, eine starke Einschränkung in der Koloniebildung. Um die Ursache festzustellen, wodurch die klonogenen Zellen eliminiert werden, wurden die Zellen hinsichtlich Apoptose, Seneszenz und Differenzierung untersucht.

Expressions- und Durchflusszytometrie-Analysen von Apoptosemarkern belegen, dass die Induktion von Apoptose in den *RAS*-infizierten Zellen niedriger war als in den Kontroll-Zellen und Apoptose damit nicht als Ursache für die eingeschränkte Klonogenität herangezogen werden kann. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Infektion von primären Zellen mit onkogenem Ras eine DNA-Schadensantwort aktiviert, die einen seneszenten Phänotyp auslöst. Seneszente Zellen zeichnen sich durch eine erhöhte Expression von p53, p21^{Cip1} und des Ink4/Arf Locus (mit den Tumor Suppressoren p16^{Ink4a}, p19^{Arf} und p15^{Ink4b}) aus. Zudem exprimieren seneszente Zellen das Enzym SA-β-Galaktosidase, dessen Aktivität in den Zellen sichtbar gemacht werden kann. Die Untersuchung der Kontrollproteine Chk1, H2A.x und ATM ergab, dass die DNA-Schadensantwort nur in den *RAS*-infizierten Zellen aktiviert war und diese durch Cytarabin weiter verstärkt wurde. Die Proteine p53, p21^{Cip1}, p16^{Ink4a}, p19^{Arf} und p15^{Ink4b} wurden in den *RAS*-infizierten Zellen stärker exprimiert als in den Kontroll-Zellen und durch Cytarabin teilweise weiter induziert (p53 und p21^{Cip1}). Dagegen wurde das Enzym SA-β-Galaktosidase, sowohl in Kontroll-Zellen als auch in *RAS*-infizierten Zellen durch die Behandlung mit Cytarabin gleichermaßen aktiviert, was einen Hinweis darauf gibt, dass Cytarabin in Kontroll-Zellen Seneszenz auslösen kann. Die oben genannten Proteine sind auch in differenzierten Zellen stärker exprimiert. Ferner löst onkogenes Ras in hämatopoetischen Zellen Differenzierung aus, was im Übrigen auch für Cytarabin gezeigt wurde. Expressions- und Durchflusszytometrie-Analysen der Differenzierungsmarker *ly6g* (Gr1) und *itgam* (Mac1) zeigen, dass *RAS*-infizierte Zellen stärker differenziert waren als Kontroll-Zellen und die Behandlung mit Cytarabin die Differenzierung weiter verstärkte. Dies wurde auch anhand der Morphologie der Zellen bestätigt. Entscheidend für die Induktion der Differenzierung war dabei die Aktivierung der DNA-Schadenssignalkaskade, was durch die zusätzliche Behandlung der Zellen mit dem ATM/R-Inhibitor Koffein belegt werden konnte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass konventionelle Zytostatika einen weiteren Mechanismus zur Tumorbekämpfung aktivieren können: Differenzierung. Differenzierung als therapeutischer Ansatz findet bereits in der Behandlung der akuten Promyelozyten Leukämie Anwendung. Die Induktion der Differenzierung könnte vor allem für Tumor-initiierende Zellen von größtem Interesse sein. Diese Krebsstammzellen werden durch herkömmliche Chemotherapeutika oft nicht vollständig eliminiert und können somit Ursache für Rezidive sein. Die Entwicklung von Substanzen, die die Differenzierung dieser Zellen aktivieren, wäre ein wichtiger Schritt der Resistenz vieler Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika entgegenzuwirken.

English summary

Ras proteins belong to a family of proto-oncogens that encode small GTPases, found to be involved in many cellular processes like cell division, apoptosis and differentiation. Remarkably, 20-30% of all human tumours contain activating mutations in the *RAS* genes. A retrospective study of a part of patients with acute myeloid leukaemia treated within CALGB 8525 revealed a correlation between *RAS*-mutations and chemotherapeutic treatment (cytarabine). AML patients harbouring oncogenic *RAS* showed significantly less cumulative incidence of relapse upon treatment with high-dose cytarabine in the post-induction chemotherapy, when compared to AML patients with oncogenic *RAS* treated with low-dose cytarabine. In contrast, dose escalation had a much weaker effect on the response to cytarabine in patients that harbour wildtype *RAS*. This study showed that an oncogenic mutation can mediate a beneficial effect towards chemotherapeutic treatment. However, the molecular basis of this observation was not understood. Therefore, the aim of this work was to investigate the effect of oncogenic *RAS* on response and the molecular mechanisms that mediate this effect in a cell system *in vitro*.

To this end, we took advantage of mouse bone marrow cells immortalized by the MLL-ENL oncogene. MLL-ENL expressing cells define a leukemia-initiating cell population resembling acute myeloid leukaemia in humans. These cells were co-infected with either an empty vector or a vector expressing oncogenic *RAS* and subsequently their response to chemotherapeutic substances like cytarabine was tested.

The cytotoxic effect of cytarabine is due to replication fork stalling which leads to the activation of the DNA-damage response followed by cell cycle arrest and apoptosis. Therefore, cytarabine targets mainly proliferating cells.

There was no difference in response to cytarabine between control cells and *RAS*-infected cells in suspension with regard to cell survival, cell cycle and apoptosis. However, when cells were cultured in semisolid media to evaluate colony formation, the treatment with chemotherapeutic drugs (cytarabine, etoposide, daunorubicine) led to a compromised colony formation only in *RAS*-infected cells. In order to identify the process responsible for elimination of clonogenic cells upon treatment, the status of apoptosis, senescence and differentiation was checked in these cells.

Expression- and flow cytometry-analysis revealed no impact of cytarabine treatment on apoptosis of *RAS*-infected cells. They rather showed less apoptosis after cytarabine treatment compared to control cells. Therefore, in the *RAS* expressing cells apoptosis

did not account for the reduced clonogenicity observed.

Previous work has showed that oncogenic Ras expressing cells activate a DNA-damage response, which subsequently leads to a senescent phenotype. Senescent cells show high expression of the tumour suppressors p53, p21^{Cip1}, p16^{Ink4a}, p19^{Arf} and p15^{Ink4b} and express SA-β-Galactosidase whose activity can be visualized.

The present work shows that the checkpoint proteins Chk1, H2A.x and ATM were activated (phosphorylated) only in *RAS*-infected cells and that treatment with cytotoxic drugs enhanced the phosphorylation of these proteins. Similarly, the expression of p53, p21^{Cip1}, p16^{Ink4a}, p19^{Arf} and p15^{Ink4b} was induced in *RAS*-infected cells and the levels of p53 and p21^{Cip1} were further enhanced upon cytarabine treatment. In contrast, cytarabine treatment led to an activation of SA-β-Galactosidase in both control cells and *RAS*-infected cells, suggesting that cytarabine induces senescence in control cell.

The above-mentioned proteins are not only highly expressed in senescent cells but also in differentiated cells. It is also known that, both oncogenic Ras and cytarabine can induce differentiation in hematopoietic cells.

Expression- and flow cytometry-analysis for the differentiation markers *Iy6g* (Gr1) and *itgam* (Mac1) revealed that *RAS*-infected cells were more differentiated than control cells and that the differentiation was further induced upon cytarabine treatment. Of note, the Ras- and cytarabine induced differentiation was inhibited upon co-treatment with the AMT/R Inhibitor caffeine, suggesting that activation of the DNA damage response pathway is critical for Ras- and cytarabine induced apoptosis.

The data of this study point out, that conventional cytostatic drugs can activate a further fail-safe mechanism, differentiation, besides inhibition of proliferation and induction of apoptosis. These *in vitro* data are consistent with the data obtained in acute promyelocytic leukaemia where induction of differentiation, by given high-doses of retinoic acid concomitantly with chemotherapy, is associated with higher cure rates and therefore is an attractive goal for anticancer therapy. Induction of differentiation is of particular interest to the eradication of tumour-initiating cells, since conventional therapeutics often do not eliminate those cells, therefore causing resistance. Screening of new compounds, which activates the differentiation of tumour-initiating cells, would be an important tool in order to counteract the resistance of tumour cells towards chemotherapeutic drugs.

7 Literaturverzeichnis

- Abraham, R. T. (2001). Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev* 15, 2177-2196.
- Abulaiti, A., Fikaris, A. J., Tsygankova, O. M., and Meinkoth, J. L. (2006). Ras induces chromosome instability and abrogation of the DNA damage response. *Cancer Res* 66, 10505-10512.
- Akinaga, S., Nomura, K., Gomi, K., and Okabe, M. (1993). Enhancement of antitumor activity of mitomycin C in vitro and in vivo by UCN-01, a selective inhibitor of protein kinase C. *Cancer Chemother Pharmacol* 32, 183-189.
- Alcorta, D. A., Xiong, Y., Phelps, D., Hannon, G., Beach, D., and Barrett, J. C. (1996). Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13742-13747.
- Asada, M., Yamada, T., Fukumuro, K., and Mizutani, S. (1998). p21Cip1/WAF1 is important for differentiation and survival of U937 cells. *Leukemia* 12, 1944-1950.
- Bakkenist, C. J., and Kastan, M. B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421, 499-506.
- Ball, H. L., Myers, J. S., and Cortez, D. (2005). ATRIP binding to replication protein A-single-stranded DNA promotes ATR-ATRIP localization but is dispensable for Chk1 phosphorylation. *Mol Biol Cell* 16, 2372-2381.
- Barabe, F., Kennedy, J. A., Hope, K. J., and Dick, J. E. (2007). Modeling the initiation and progression of human acute leukemia in mice. *Science* 316, 600-604.
- Bartkova, J., Rezaei, N., Lontos, M., Karakaidos, P., Kletsas, D., Issaeva, N., Vassiliou, L. V., Kolettas, E., Niforou, K., Zoumpourlis, V. C., et al. (2006). Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* 444, 633-637.
- Bassing, C. H., and Alt, F. W. (2004). H2AX may function as an anchor to hold broken chromosomal DNA ends in close proximity. *Cell Cycle* 3, 149-153.
- Bates, S., Phillips, A. C., Clark, P. A., Stott, F., Peters, G., Ludwig, R. L., and Vousden, K. H. (1998). p14ARF links the tumour suppressors RB and p53. *Nature* 395, 124-125.
- Behm, F. G., Raimondi, S. C., Frestedt, J. L., Liu, Q., Crist, W. M., Downing, J. R., Rivera, G. K., Kersey, J. H., and Pui, C. H. (1996). Rearrangement of the MLL gene confers a poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia, regardless of presenting age. *Blood* 87, 2870-2877.
- Behre, G., Singh, S. M., Liu, H., Bortolin, L. T., Christopeit, M., Radomska, H. S., Rangatia, J., Hiddemann, W., Friedman, A. D., and Tenen, D. G. (2002). Ras signaling enhances the activity of C/EBP alpha to induce granulocytic differentiation by phosphorylation of serine 248. *J Biol Chem* 277, 26293-26299.
- Behre, G., Whitmarsh, A. J., Coghlan, M. P., Hoang, T., Carpenter, C. L., Zhang, D. E., Davis, R. J., and Tenen, D. G. (1999). c-Jun is a JNK-independent coactivator of the PU.1 transcription factor. *J Biol Chem* 274, 4939-4946.
- Bonnet, D., and Dick, J. E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3, 730-737.
- Bos, J. L. (1989). ras oncogenes in human cancer: A review. *Cancer Research* 49, 4682-4689.

- Bos, J. L., Rehmann, H., and Wittinghofer, A. (2007). GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* 129, 865-877.
- Bos, J. L., Toksoz, D., Marshall, C. J., Verlaan-de Vries, M., Veeneman, G. H., Vandereb, A. J., Vanboom, J. H., Janssen, J. W. G., and Steenvoorden, A. C. M. (1985). Amino acid substitution at codon 13 of the N-ras oncogene in human acute myeloid leukemia. *Nature (Lond)* 315, 726-730.
- Bouchard, C., Lee, S., Paulus-Hock, V., Loddenkemper, C., Eilers, M., and Schmitt, C. A. (2007). FoxO transcription factors suppress Myc-driven lymphomagenesis via direct activation of Arf. *Genes Dev* 21, 2775-2787.
- Braig, M., Lee, S., Loddenkemper, C., Rudolph, C., Peters, A. H., Schlegelberger, B., Stein, H., Dorken, B., Jenuwein, T., and Schmitt, C. A. (2005). Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* 436, 660-665.
- Braun, B. S., Tuveson, D. A., Kong, N., Le, D. T., Kogan, S. C., Rozmus, J., Le Beau, M. M., Jacks, T. E., and Shannon, K. M. (2004). Somatic activation of oncogenic Kras in hematopoietic cells initiates a rapidly fatal myeloproliferative disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 597-602.
- Brown, A. L., Lee, C. H., Schwarz, J. K., Mitiku, N., Piwnica-Worms, H., and Chung, J. H. (1999). A human Cds1-related kinase that functions downstream of ATM protein in the cellular response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3745-3750.
- Bunch, R. T., and Eastman, A. (1996). Enhancement of cisplatin-induced cytotoxicity by 7-hydroxystaurosporine (UCN-01), a new G2-checkpoint inhibitor. *Clin Cancer Res* 2, 791-797.
- Burma, S., Chen, B. P., Murphy, M., Kurimasa, A., and Chen, D. J. (2001). ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 276, 42462-42467.
- Cain, K., Bratton, S. B., Langlais, C., Walker, G., Brown, D. G., Sun, X. M., and Cohen, G. M. (2000). Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes. *J Biol Chem* 275, 6067-6070.
- Chan, I. T., Kutok, J. L., Williams, I. R., Cohen, S., Kelly, L., Shigematsu, H., Johnson, L., Akashi, K., Tuveson, D. A., Jacks, T., and Gilliland, D. G. (2004). Conditional expression of oncogenic K-ras from its endogenous promoter induces a myeloproliferative disease. *J Clin Invest* 113, 528-538.
- Chan, I. T., Kutok, J. L., Williams, I. R., Cohen, S., Moore, S., Shigematsu, H., Ley, T. J., Akashi, K., Le Beau, M. M., and Gilliland, D. G. (2006). Oncogenic K-ras cooperates with PML-RAR alpha to induce an acute promyelocytic leukemia-like disease. *Blood* 108, 1708-1715.
- Chang, B. D., Broude, E. V., Dokmanovic, M., Zhu, H., Ruth, A., Xuan, Y., Kandel, E. S., Lausch, E., Christov, K., and Roninson, I. B. (1999). A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents. *Cancer Res* 59, 3761-3767.
- Chaturvedi, P., Eng, W. K., Zhu, Y., Mattern, M. R., Mishra, R., Hurle, M. R., Zhang, X., Annan, R. S., Lu, Q., Faucette, L. F., et al. (1999). Mammalian Chk2 is a downstream effector of the ATM-dependent DNA damage checkpoint pathway. *Oncogene* 18, 4047-4054.

- Chehab, N. H., Malikzay, A., Stavridi, E. S., and Halazonetis, T. D. (1999). Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13777-13782.
- Chen, C., Shimizu, S., Tsujimoto, Y., and Motoyama, N. (2005a). Chk2 regulates transcription-independent p53-mediated apoptosis in response to DNA damage. *Biochem Biophys Res Commun* 333, 427-431.
- Chen, C. S., Sorensen, P. H., Domer, P. H., Reaman, G. H., Korsmeyer, S. J., Heerema, N. A., Hammond, G. D., and Kersey, J. H. (1993). Molecular rearrangements on chromosome 11q23 predominate in infant acute lymphoblastic leukemia and are associated with specific biologic variables and poor outcome. *Blood* 81, 2386-2393.
- Chen, L., Gilkes, D. M., Pan, Y., Lane, W. S., and Chen, J. (2005b). ATM and Chk2-dependent phosphorylation of MDMX contribute to p53 activation after DNA damage. *Embo J* 24, 3411-3422.
- Chen, Z., Trotman, L. C., Shaffer, D., Lin, H. K., Dotan, Z. A., Niki, M., Koutcher, J. A., Scher, H. I., Ludwig, T., Gerald, W., et al. (2005c). Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* 436, 725-730.
- Chen, Z., Xiao, Z., Chen, J., Ng, S. C., Sowin, T., Sham, H., Rosenberg, S., Fesik, S., and Zhang, H. (2003). Human Chk1 expression is dispensable for somatic cell death and critical for sustaining G2 DNA damage checkpoint. *Mol Cancer Ther* 2, 543-548.
- Chin, L., Tam, A., Pomerantz, J., Wong, M., Holash, J., Bardeesy, N., Shen, Q., O'Hagan, R., Pantginis, J., Zhou, H., et al. (1999). Essential role for oncogenic Ras in tumour maintenance. *Nature* 400, 468-472.
- Chipuk, J. E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N. M., Newmeyer, D. D., Schuler, M., and Green, D. R. (2004). Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* 303, 1010-1014.
- Collado, M., Gil, J., Efeyan, A., Guerra, C., Schuhmacher, A. J., Barradas, M., Benguria, A., Zaballos, A., Flores, J. M., Barbacid, M., et al. (2005). Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* 436, 642.
- Colombo, E., Martinelli, P., Zamponi, R., Shing, D. C., Bonetti, P., Luzi, L., Volorio, S., Bernard, L., Pruneri, G., Alcalay, M., and Pelicci, P. G. (2006). Delocalization and destabilization of the Arf tumor suppressor by the leukemia-associated NPM mutant. *Cancer Res* 66, 3044-3050.
- Conti, C., Sacca, B., Herrick, J., Lalou, C., Pommier, Y., and Bensimon, A. (2007). Replication fork velocities at adjacent replication origins are coordinately modified during DNA replication in human cells. *Mol Biol Cell* 18, 3059-3067.
- Cortez, D., Guntuku, S., Qin, J., and Elledge, S. J. (2001). ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. *Science* 294, 1713-1716.
- Cozzio, A., Passegue, E., Ayton, P. M., Karsunky, H., Cleary, M. L., and Weissman, I. L. (2003). Similar MLL-associated leukemias arising from self-renewing stem cells and short-lived myeloid progenitors. *Genes Dev* 17, 3029-3035.
- Crespo, P., and Leon, J. (2000). Ras proteins in the control of the cell cycle and cell differentiation. *Cell Mol Life Sci* 57, 1613-1636.
- Cuadrado, M., Martinez-Pastor, B., Murga, M., Toledo, L. I., Gutierrez-Martinez, P., Lopez, E., and Fernandez-Capetillo, O. (2006). ATM regulates ATR chromatin loading in response to DNA double-strand breaks. *J Exp Med* 203, 297-303.

- D'Amours, D., and Jackson, S. P. (2002). The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 317-327.
- Darley, R. L., and Burnett, A. K. (1999). Mutant RAS inhibits neutrophil but not macrophage differentiation and allows continued growth of neutrophil precursors. *Exp Hematol* 27, 1599-1608.
- Davis, M. A., Flaws, J. A., Young, M., Collins, K., and Colburn, N. H. (2000). Effect of ceramide on intracellular glutathione determines apoptotic or necrotic cell death of JB6 tumor cells. *Toxicol Sci* 53, 48-55.
- Di Micco, R., Fumagalli, M., Cicalese, A., Piccinin, S., Gasparini, P., Luise, C., Schurra, C., Garre, M., Nuciforo, P. G., Bensimon, A., et al. (2006). Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* 444, 638-642.
- Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., and et al. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9363-9367.
- DiPearn, L., Fisher, J., Burnett, A. K., and Darley, R. L. (2007). The role of PKC and PDK1 in monocyte lineage specification by Ras. *Blood* 109, 4461-4469.
- Dornan, D., Shimizu, H., Perkins, N. D., and Hupp, T. R. (2003). DNA-dependent acetylation of p53 by the transcription coactivator p300. *J Biol Chem* 278, 13431-13441.
- Dorrell, C., Takenaka, K., Minden, M. D., Hawley, R. G., and Dick, J. E. (2004). Hematopoietic cell fate and the initiation of leukemic properties in primitive primary human cells are influenced by Ras activity and farnesyltransferase inhibition. *Mol Cell Biol* 24, 6993-7002.
- Estey, E., and Dohner, H. (2006). Acute myeloid leukaemia. *Lancet* 368, 1894-1907.
- Falck, J., Petrini, J. H., Williams, B. R., Lukas, J., and Bartek, J. (2002). The DNA damage-dependent intra-S phase checkpoint is regulated by parallel pathways. *Nat Genet* 30, 290-294.
- Fenaux, P., Preudhomme, C., Lai, J. L., Morel, P., Beuscart, R., and Bauters, F. (1989). Cytogenetics and their prognostic value in de novo acute myeloid leukaemia: a report on 283 cases. *Br J Haematol* 73, 61-67.
- Feramisco, J. R., Gross, M., Kamata, T., Rosenberg, M., and Sweet, R. W. (1984). Microinjection of the oncogene form of the human H-ras (T-24) protein results in rapid proliferation of quiescent cells. *Cell* 38, 109-117.
- Forster, A., Pannell, R., Drynan, L. F., McCormack, M., Collins, E. C., Daser, A., and Rabbitts, T. H. (2003). Engineering de novo reciprocal chromosomal translocations associated with MLL to replicate primary events of human cancer. *Cancer Cell* 3, 449-458.
- Friesner, J. D., Liu, B., Culligan, K., and Britt, A. B. (2005). Ionizing radiation-dependent gamma-H2AX focus formation requires ataxia telangiectasia mutated and ataxia telangiectasia mutated and Rad3-related. *Mol Biol Cell* 16, 2566-2576.
- Frohling, S., Scholl, C., Gilliland, D. G., and Levine, R. L. (2005). Genetics of myeloid malignancies: pathogenetic and clinical implications. *J Clin Oncol* 23, 6285-6295.

- Fu, J. F., Liang, D. C., and Shih, L. Y. (2007). Analysis of acute leukemias with MLL/ENL fusion transcripts: identification of two novel breakpoints in ENL. *Am J Clin Pathol* 127, 24-30.
- Furuta, T., Takemura, H., Liao, Z. Y., Aune, G. J., Redon, C., Sedelnikova, O. A., Pilch, D. R., Rogakou, E. P., Celeste, A., Chen, H. T., et al. (2003). Phosphorylation of histone H2AX and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replication-dependent DNA double-strand breaks induced by mammalian DNA topoisomerase I cleavage complexes. *J Biol Chem* 278, 20303-20312.
- Gilliland, D. G. (2002). Molecular genetics of human leukemias: new insights into therapy. *Semin Hematol* 39, 6-11.
- Grimwade, D., Walker, H., Oliver, F., Wheatley, K., Harrison, C., Harrison, G., Rees, J., Hann, I., Stevens, R., Burnett, A., and Goldstone, A. (1998). The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood* 92, 2322-2333.
- Gross, I., Bassit, B., Benezra, M., and Licht, J. D. (2001). Mammalian sprouty proteins inhibit cell growth and differentiation by preventing ras activation. *J Biol Chem* 276, 46460-46468.
- Groth, A., Weber, J. D., Willumsen, B. M., Sherr, C. J., and Roussel, M. F. (2000). Oncogenic Ras induces p19ARF and growth arrest in mouse embryo fibroblasts lacking p21Cip1 and p27Kip1 without activating cyclin D-dependent kinases. *J Biol Chem* 275, 27473-27480.
- Guenther, M. G., Levine, S. S., Boyer, L. A., Jaenisch, R., and Young, R. A. (2007). A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell* 130, 77-88.
- Hahn, W. C., Counter, C. M., Lundberg, A. S., Beijersbergen, R. L., Brooks, M. W., and Weinberg, R. A. (1999). Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 400, 464-468.
- Hall-Jackson, C. A., Cross, D. A., Morrice, N., and Smythe, C. (1999). ATR is a caffeine-sensitive, DNA-activated protein kinase with a substrate specificity distinct from DNA-PK. *Oncogene* 18, 6707-6713.
- Hawley, R. G., Fong, A. Z., Ngan, B. Y., and Hawley, T. S. (1995). Hematopoietic transforming potential of activated ras in chimeric mice. *Oncogene* 11, 1113-1123.
- Hibi, S., Lohler, J., Friel, J., Stocking, C., and Ostertag, W. (1993). Induction of monocytic differentiation and tumorigenicity by v-Ha-ras in differentiation arrested hematopoietic cells. *Blood* 81, 1841-1848.
- Hsueh, C. T., Kelsen, D., and Schwartz, G. K. (1998). UCN-01 suppresses thymidylate synthase gene expression and enhances 5-fluorouracil-induced apoptosis in a sequence-dependent manner. *Clin Cancer Res* 4, 2201-2206.
- Huang, C. L., Deng, M. L., Guo, R. J., Wu, M. T., Liu, F. Z., Liang, Y. M., and Qiao, Q. D. (1988). A study on the induction of differentiation of human leukemic cells by harringtonine combined with cytarabine. *Leukemia* 2, 518-522.
- Hueber, A. O., and Evan, G. I. (1998). Traps to catch unwary oncogenes. *Trends Genet* 14, 364-367.
- Huntly, B. J., and Gilliland, D. G. (2005). Cancer biology: summing up cancer stem cells. *Nature* 435, 1169-1170.

- Huret, J. L., Dessen, P., and Bernheim, A. (2001). An atlas of chromosomes in hematological malignancies. Example: 11q23 and MLL partners. *Leukemia* 15, 987-989.
- Kaneko, Y. S., Watanabe, N., Morisaki, H., Akita, H., Fujimoto, A., Tominaga, K., Terasawa, M., Tachibana, A., Ikeda, K., and Nakanishi, M. (1999). Cell-cycle-dependent and ATM-independent expression of human Chk1 kinase. *Oncogene* 18, 3673-3681.
- Karin, M., and Lin, A. (2002). NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 3, 221-227.
- Kerkhoff, E., and Rapp, U. R. (1997). Induction of cell proliferation in quiescent NIH 3T3 cells by oncogenic c-Raf-1. *Mol Cell Biol* 17, 2576-2586.
- Khanna, K. K., and Jackson, S. P. (2001). DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* 27, 247-254.
- Kinoshita, T., Shirouzu, M., Kamiya, A., Hashimoto, K., Yokoyama, S., and Miyajima, A. (1997). Raf/MAPK and rapamycin-sensitive pathways mediate the anti-apoptotic function of p21Ras in IL-3-dependent hematopoietic cells. *Oncogene* 15, 619-627.
- Koniaras, K., Cuddihy, A. R., Christopoulos, H., Hogg, A., and O'Connell, M. J. (2001). Inhibition of Chk1-dependent G2 DNA damage checkpoint radiosensitizes p53 mutant human cells. *Oncogene* 20, 7453-7463.
- Krivtsov, A. V., and Armstrong, S. A. (2007). MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat Rev Cancer* 7, 823-833.
- Krivtsov, A. V., Twomey, D., Feng, Z., Stubbs, M. C., Wang, Y., Faber, J., Levine, J. E., Wang, J., Hahn, W. C., Gilliland, D. G., et al. (2006). Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature* 442, 818-822.
- Kulkarni, A., and Das, K. C. (2008). Differential roles of ATR and ATM in p53, Chk1, and histone H2AX phosphorylation in response to hyperoxia: ATR-dependent ATM activation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294, L998-L1006.
- Kumagai, A., Lee, J., Yoo, H. Y., and Dunphy, W. G. (2006). TopBP1 activates the ATR-ATRIP complex. *Cell* 124, 943-955.
- Kurki, S., Peltonen, K., Latonen, L., Kiviharju, T. M., Ojala, P. M., Meek, D., and Laiho, M. (2004). Nucleolar protein NPM interacts with HDM2 and protects tumor suppressor protein p53 from HDM2-mediated degradation. *Cancer Cell* 5, 465-475.
- LaBaer, J., Garrett, M. D., Stevenson, L. F., Slingerland, J. M., Sandhu, C., Chou, H. S., Fattaey, A., and Harlow, E. (1997). New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev* 11, 847-862.
- Lachner, M., O'Sullivan, R. J., and Jenuwein, T. (2003). An epigenetic road map for histone lysine methylation. *J Cell Sci* 116, 2117-2124.
- Lakin, N. D., Hann, B. C., and Jackson, S. P. (1999). The ataxia-telangiectasia related protein ATR mediates DNA-dependent phosphorylation of p53. *Oncogene* 18, 3989-3995.
- Lam, M. H., Liu, Q., Elledge, S. J., and Rosen, J. M. (2004). Chk1 is haploinsufficient for multiple functions critical to tumor suppression. *Cancer Cell* 6, 45-59.
- Land, H., Parada, L. F., and Weinberg, R. A. (1983). Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* 304, 596-602.
- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M. A., and Dick, J. E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367, 645-648.

- Larner, J. M., Lee, H., Little, R. D., Dijkwel, P. A., Schildkraut, C. L., and Hamlin, J. L. (1999). Radiation down-regulates replication origin activity throughout the S phase in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 27, 803-809.
- Larsen, J., Beug, H., and Hayman, M. J. (1992). The v-ski oncogene cooperates with the v-sea oncogene in erythroid transformation by blocking erythroid differentiation. *Oncogene* 7, 1903-1911.
- Laurent, G., and Jaffrezou, J. P. (2001). Signaling pathways activated by daunorubicin. *Blood* 98, 913-924.
- Liu, Q., Guntuku, S., Cui, X. S., Matsuoka, S., Cortez, D., Tamai, K., Luo, G., Carattini-Rivera, S., DeMayo, F., Bradley, A., et al. (2000). Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev* 14, 1448-1459.
- Lois, A. F., Cooper, L. T., Geng, Y., Nobori, T., and Carson, D. (1995). Expression of the p16 and p15 cyclin-dependent kinase inhibitors in lymphocyte activation and neuronal differentiation. *Cancer Res* 55, 4010-4013.
- Lukas, C., Bartkova, J., Latella, L., Falck, J., Mailand, N., Schroeder, T., Sehested, M., Lukas, J., and Bartek, J. (2001). DNA damage-activated kinase Chk2 is independent of proliferation or differentiation yet correlates with tissue biology. *Cancer Res* 61, 4990-4993.
- MacDougall, C. A., Byun, T. S., Van, C., Yee, M. C., and Cimprich, K. A. (2007). The structural determinants of checkpoint activation. *Genes Dev* 21, 898-903.
- Maher, J., Colonna, F., Baker, D., Luzzatto, L., and Roberts, I. (1994). Retroviral-mediated gene transfer of a mutant H-ras gene into normal human bone marrow alters myeloid cell proliferation and differentiation. *Exp Hematol* 22, 8-12.
- Mailand, N., Falck, J., Lukas, C., Syljuasen, R. G., Welcker, M., Bartek, J., and Lukas, J. (2000). Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *Science* 288, 1425-1429.
- Mallette, F. A., Gaumont-Leclerc, M. F., and Ferbeyre, G. (2007). The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence. *Genes Dev* 21, 43-48.
- Malumbres, M., Perez De Castro, I., Hernandez, M. I., Jimenez, M., Corral, T., and Pellicer, A. (2000). Cellular response to oncogenic ras involves induction of the Cdk4 and Cdk6 inhibitor p15(INK4b). *Mol Cell Biol* 20, 2915-2925.
- Maya-Mendoza, A., Petermann, E., Gillespie, D. A., Caldecott, K. W., and Jackson, D. A. (2007). Chk1 regulates the density of active replication origins during the vertebrate S phase. *Embo J* 26, 2719-2731.
- Mayer, R., Davis, R., Schiffer, C., Berg, D., Powell, B., Schulman, P., Omura, G., Moore, J., McIntyre, O., and Frei, E. (1994). Intensive postremission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia: Cancer and Leukemia Group B. *New Engl J Med* 331, 896-903.
- Mazzoni, I. E., Said, F. A., Aloyz, R., Miller, F. D., and Kaplan, D. (1999). Ras regulates sympathetic neuron survival by suppressing the p53-mediated cell death pathway. *J Neurosci* 19, 9716-9727.
- McNeill, H., and Downward, J. (1999). Apoptosis: Ras to the rescue in the fly eye. *Curr Biol* 9, R176-179.

- Michaloglou, C., Vredeveld, L. C., Soengas, M. S., Denoyelle, C., Kuilman, T., van der Horst, C. M., Majoor, D. M., Shay, J. W., Mooi, W. J., and Peeper, D. S. (2005). BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 436, 720-724.
- Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P., and Moll, U. M. (2003). p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell* 11, 577-590.
- Milne, T. A., Martin, M. E., Brock, H. W., Slany, R. K., and Hess, J. L. (2005). Leukemogenic MLL fusion proteins bind across a broad region of the Hox a9 locus, promoting transcription and multiple histone modifications. *Cancer Res* 65, 11367-11374.
- Missero, C., Di Cunto, F., Kiyokawa, H., Koff, A., and Dotto, G. P. (1996). The absence of p21Cip1/WAF1 alters keratinocyte growth and differentiation and promotes ras-tumor progression. *Genes Dev* 10, 3065-3075.
- Moll, U. M., Wolff, S., Speidel, D., and Deppert, W. (2005). Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53. *Curr Opin Cell Biol* 17, 631-636.
- Montecucco, A., and Biamonti, G. (2007). Cellular response to etoposide treatment. *Cancer Lett* 252, 9-18.
- Mueller, D., Bach, C., Zeisig, D., Garcia-Cuellar, M. P., Monroe, S., Sreekumar, A., Zhou, R., Nesvizhskii, A., Chinnaiyan, A., Hess, J. L., and Slany, R. K. (2007). A role for the MLL fusion partner ENL in transcriptional elongation and chromatin modification. *Blood* 110, 4445-4454.
- Na Nakorn, T., Traver, D., Weissman, I. L., and Akashi, K. (2002). Myeloerythroid-restricted progenitors are sufficient to confer radioprotection and provide the majority of day 8 CFU-S. *J Clin Invest* 109, 1579-1585.
- Nagler, A., Kletter, Y., Ricklis, I., Gazit, E., Tatarsky, I., and Fabian, I. (1986). Effect of cytosine arabinoside on differentiation of normal human bone marrow cells. *Exp Hematol* 14, 241-245.
- Neubauer, A., Maharry, K., Mrozek, K., Thiede, C., Marcucci, G., Paschka, P., Mayer, R. J., Larson, R. A., Liu, E. T., and Bloomfield, C. D. (2008). Patients With Acute Myeloid Leukemia and RAS Mutations Benefit Most From Postremission High-Dose Cytarabine: A Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol*.
- Nitani, N., Nakamura, K., Nakagawa, C., Masukata, H., and Nakagawa, T. (2006). Regulation of DNA replication machinery by Mrc1 in fission yeast. *Genetics* 174, 155-165.
- O'Neill, T., Giarratani, L., Chen, P., Iyer, L., Lee, C. H., Bobiak, M., Kanai, F., Zhou, B. B., Chung, J. H., and Rathbun, G. A. (2002). Determination of substrate motifs for human Chk1 and hCds1/Chk2 by the oriented peptide library approach. *J Biol Chem* 277, 16102-16115.
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., and Tanaka, N. (2000). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 288, 1053-1058.
- Ohtani, N., Zebedee, Z., Huot, T. J., Stinson, J. A., Sugimoto, M., Ohashi, Y., Sharrocks, A. D., Peters, G., and Hara, E. (2001). Opposing effects of Ets and Id proteins on p16INK4a expression during cellular senescence. *Nature* 409, 1067-1070.
- Olson, M. F., Paterson, H. F., and Marshall, C. J. (1998). Signals from Ras and Rho GTPases interact to regulate expression of p21Waf1/Cip1. *Nature* 394, 295-299.

- Opferman, J. T., Iwasaki, H., Ong, C. C., Suh, H., Mizuno, S., Akashi, K., and Korsmeyer, S. J. (2005). Obligate role of anti-apoptotic MCL-1 in the survival of hematopoietic stem cells. *Science* 307, 1101-1104.
- Ou, Y. H., Chung, P. H., Sun, T. P., and Shieh, S. Y. (2005). p53 C-terminal phosphorylation by CHK1 and CHK2 participates in the regulation of DNA-damage-induced C-terminal acetylation. *Mol Biol Cell* 16, 1684-1695.
- Palmero, I., Pantoja, C., and Serrano, M. (1998). p19ARF links the tumour suppressor p53 to Ras. *Nature* 395, 125-126.
- Pardal, R., Clarke, M. F., and Morrison, S. J. (2003). Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer* 3, 895-902.
- Parikh, C., Subrahmanyam, R., and Ren, R. (2006). Oncogenic NRAS rapidly and efficiently induces CMML- and AML-like diseases in mice. *Blood* 108, 2349-2357.
- Park, J. S., Qiao, L., Gilfor, D., Yang, M. Y., Hylemon, P. B., Benz, C., Darlington, G., Firestone, G., Fisher, P. B., and Dent, P. (2000). A role for both Ets and C/EBP transcription factors and mRNA stabilization in the MAPK-dependent increase in p21 (Cip-1/WAF1/mda6) protein levels in primary hepatocytes. *Mol Biol Cell* 11, 2915-2932.
- Peng, C. Y., Graves, P. R., Thoma, R. S., Wu, Z., Shaw, A. S., and Piwnicka-Worms, H. (1997). Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science* 277, 1501-1505.
- Petrini, J. H., and Stracker, T. H. (2003). The cellular response to DNA double-strand breaks: defining the sensors and mediators. *Trends Cell Biol* 13, 458-462.
- Prasad, R., Yano, T., Sorio, C., Nakamura, T., Rallapalli, R., Gu, Y., Leshkowitz, D., Croce, C. M., and Canaani, E. (1995). Domains with transcriptional regulatory activity within the ALL1 and AF4 proteins involved in acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 12160-12164.
- Prieur, A., and Peeper, D. S. (2008). Cellular senescence in vivo: a barrier to tumorigenesis. *Curr Opin Cell Biol* 20, 150-155.
- Pruitt, K., and Der, C. J. (2001). Ras and Rho regulation of the cell cycle and oncogenesis. *Cancer Lett* 171, 1-10.
- Pumiglia, K. M., and Decker, S. J. (1997). Cell cycle arrest mediated by the MEK/mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 448-452.
- Qian, Y., and Chen, X. (2008). ID1, inhibitor of differentiation/DNA binding, is an effector of the p53-dependent DNA damage response pathway. *J Biol Chem* 283, 22410-22416.
- Reddy, V. A., Iwama, A., Iotzova, G., Schulz, M., Elsasser, A., Vangala, R. K., Tenen, D. G., Hiddemann, W., and Behre, G. (2002). Granulocyte inducer C/EBPalpha inactivates the myeloid master regulator PU.1: possible role in lineage commitment decisions. *Blood* 100, 483-490.
- Renneville, A., Roumier, C., Biggio, V., Nibourel, O., Boissel, N., Fenaux, P., and Preudhomme, C. (2008). Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. *Leukemia* 22, 915-931.
- Roberge, M., Berlinck, R. G., Xu, L., Anderson, H. J., Lim, L. Y., Curman, D., Stringer, C. M., Friend, S. H., Davies, P., Vincent, I., et al. (1998). High-throughput assay for G2

- checkpoint inhibitors and identification of the structurally novel compound isogranulatimide. *Cancer Res* 58, 5701-5706.
- Rosseland, C. M., Wierod, L., Flinder, L. I., Oksvold, M. P., Skarpen, E., and Huitfeldt, H. S. (2008). Distinct functions of H-Ras and K-Ras in proliferation and survival of primary hepatocytes due to selective activation of ERK and PI3K. *J Cell Physiol* 215, 818-826.
- Rouse, J., and Jackson, S. P. (2002). Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage. *Science* 297, 547-551.
- Rubnitz, J. E., Camitta, B. M., Mahmoud, H., Raimondi, S. C., Carroll, A. J., Borowitz, M. J., Shuster, J. J., Link, M. P., Pullen, D. J., Downing, J. R., et al. (1999). Childhood acute lymphoblastic leukemia with the MLL-ENL fusion and t(11;19)(q23;p13.3) translocation. *J Clin Oncol* 17, 191-196.
- Rubnitz, J. E., Morrissey, J., Savage, P. A., and Cleary, M. L. (1994). ENL, the gene fused with HRX in t(11;19) leukemias, encodes a nuclear protein with transcriptional activation potential in lymphoid and myeloid cells. *Blood* 84, 1747-1752.
- Russell, K. J., Wiens, L. W., Demers, G. W., Galloway, D. A., Plon, S. E., and Groudine, M. (1995). Abrogation of the G2 checkpoint results in differential radiosensitization of G1 checkpoint-deficient and G1 checkpoint-competent cells. *Cancer Res* 55, 1639-1642.
- Sarkaria, J. N., Busby, E. C., Tibbetts, R. S., Roos, P., Taya, Y., Karnitz, L. M., and Abraham, R. T. (1999). Inhibition of ATM and ATR kinase activities by the radiosensitizing agent, caffeine. *Cancer Res* 59, 4375-4382.
- Sarkisian, C. J., Keister, B. A., Stairs, D. B., Boxer, R. B., Moody, S. E., and Chodosh, L. A. (2007). Dose-dependent oncogene-induced senescence in vivo and its evasion during mammary tumorigenesis. *Nat Cell Biol* 9, 493-505.
- Sax, J. K., Fei, P., Murphy, M. E., Bernhard, E., Korsmeyer, S. J., and El-Deiry, W. S. (2002). BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity. *Nat Cell Biol* 4, 842-849.
- Scharenberg, C. W., Harkey, M. A., and Torok-Storb, B. (2002). The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood* 99, 507-512.
- Schmidt, M., Koller, R., Haviernik, P., Bies, J., Maciag, K., and Wolff, L. (2001). Deregulated c-Myb expression in murine myeloid leukemias prevents the up-regulation of p15(INK4b) normally associated with differentiation. *Oncogene* 20, 6205-6214.
- Schubbert, S., Shannon, K., and Bollag, G. (2007). Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer* 7, 295-308.
- Seiler, J. A., Conti, C., Syed, A., Aladjem, M. I., and Pommier, Y. (2007). The intra-S-phase checkpoint affects both DNA replication initiation and elongation: single-cell and -DNA fiber analyses. *Mol Cell Biol* 27, 5806-5818.
- Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D., and Lowe, S. W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88, 593-602.
- Shao, R. G., Shimizu, T., and Pommier, Y. (1997). 7-Hydroxystaurosporine (UCN-01) induces apoptosis in human colon carcinoma and leukemia cells independently of p53. *Exp Cell Res* 234, 388-397.
- Shay, J. W., and Roninson, I. B. (2004). Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. *Oncogene* 23, 2919-2933.

- Shen, M., Yoshida, E., Yan, W., Kawamoto, T., Suardita, K., Koyano, Y., Fujimoto, K., Noshiro, M., and Kato, Y. (2002). Basic helix-loop-helix protein DEC1 promotes chondrocyte differentiation at the early and terminal stages. *J Biol Chem* 277, 50112-50120.
- Shen, S., Passioura, T., Symonds, G., and Dolnikov, A. (2007). N-ras oncogene-induced gene expression in human hematopoietic progenitor cells: upregulation of p16INK4a and p21CIP1/WAF1 correlates with myeloid differentiation. *Exp Hematol* 35, 908-919.
- Shen, S. W., Dolnikov, A., Passioura, T., Millington, M., Wotherspoon, S., Rice, A., MacKenzie, K. L., and Symonds, G. (2004). Mutant N-ras preferentially drives human CD34+ hematopoietic progenitor cells into myeloid differentiation and proliferation both in vitro and in the NOD/SCID mouse. *Exp Hematol* 32, 852-860.
- Sherr, C. J., and Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13, 1501-1512.
- Shieh, S. Y., Ahn, J., Tamai, K., Taya, Y., and Prives, C. (2000). The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev* 14, 289-300.
- Shih, C., and Weinberg, R. A. (1982). Isolation of a transforming sequence from a human bladder carcinoma cell line. *Cell* 29, 161-169.
- Shiloh, Y. (2003). ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* 3, 155-168.
- Slany, R. K., Lavau, C., and Cleary, M. L. (1998). The oncogenic capacity of HRX-ENL requires the transcriptional transactivation activity of ENL and the DNA binding motifs of HRX. *Mol Cell Biol* 18, 122-129.
- Sorensen, C. S., Syljuasen, R. G., Falck, J., Schroeder, T., Ronnstrand, L., Khanna, K. K., Zhou, B. B., Bartek, J., and Lukas, J. (2003). Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A. *Cancer Cell* 3, 247-258.
- Sorensen, P. H., Chen, C. S., Smith, F. O., Arthur, D. C., Domer, P. H., Bernstein, I. D., Korsmeyer, S. J., Hammond, G. D., and Kersey, J. H. (1994). Molecular rearrangements of the MLL gene are present in most cases of infant acute myeloid leukemia and are strongly correlated with monocytic or myelomonocytic phenotypes. *J Clin Invest* 93, 429-437.
- Sreeramaneni, R., Chaudhry, A., McMahon, M., Sherr, C. J., and Inoue, K. (2005). Ras-Raf-Arf signaling critically depends on the Dmp1 transcription factor. *Mol Cell Biol* 25, 220-232.
- Stevens, C., Smith, L., and La Thangue, N. B. (2003). Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage. *Nat Cell Biol* 5, 401-409.
- Stiff, T., Walker, S. A., Cerosaletti, K., Goodarzi, A. A., Petermann, E., Concannon, P., O'Driscoll, M., and Jeggo, P. A. (2006). ATR-dependent phosphorylation and activation of ATM in response to UV treatment or replication fork stalling. *Embo J* 25, 5775-5782.
- Sugimoto, K., Tamayose, K., Takagi, M., Yamada, K., Sasaki, M., Mizutani, S., and Oshimi, K. (2000). Activation of an ataxia telangiectasia mutation-dependent intra-S-phase checkpoint by anti-tumour drugs in HL-60 and human lymphoblastoid cells. *Br J Haematol* 110, 819-825.

- Takagaki, K., Katsuma, S., Kaminishi, Y., Horio, T., Tanaka, T., Ohgi, T., and Yano, J. (2005). Role of Chk1 and Chk2 in Ara-C-induced differentiation of human leukemia K562 cells. *Genes Cells* 10, 97-106.
- Takai, H., Tominaga, K., Motoyama, N., Minamishima, Y. A., Nagahama, H., Tsukiyama, T., Ikeda, K., Nakayama, K., Nakanishi, M., and Nakayama, K. (2000). Aberrant cell cycle checkpoint function and early embryonic death in Chk1(-/-) mice. *Genes Dev* 14, 1439-1447.
- Tenen, D. G. (2003). Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. *Nat Rev Cancer* 3, 89-101.
- Teofili, L., Morosetti, R., Martini, M., Urbano, R., Putzulu, R., Rutella, S., Pierelli, L., Leone, G., and Larocca, L. M. (2000). Expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p15(INK4B) during normal and leukemic myeloid differentiation. *Exp Hematol* 28, 519-526.
- Terada, K., Kaziro, Y., and Satoh, T. (2000). Analysis of Ras-dependent signals that prevent caspase-3 activation and apoptosis induced by cytokine deprivation in hematopoietic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 267, 449-455.
- Terskikh, A. V., Miyamoto, T., Chang, C., Diatchenko, L., and Weissman, I. L. (2003). Gene expression analysis of purified hematopoietic stem cells and committed progenitors. *Blood* 102, 94-101.
- Tibbetts, R. S., Brumbaugh, K. M., Williams, J. M., Sarkaria, J. N., Cliby, W. A., Shieh, S. Y., Taya, Y., Prives, C., and Abraham, R. T. (1999). A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev* 13, 152-157.
- Vivanco, I., and Sawyers, C. L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2, 489-501.
- Wandzioch, E., Edling, C. E., Palmer, R. H., Carlsson, L., and Hallberg, B. (2004). Activation of the MAP kinase pathway by c-Kit is PI-3 kinase dependent in hematopoietic progenitor/stem cell lines. *Blood* 104, 51-57.
- Wang, H., Wang, X., Zhou, X. Y., Chen, D. J., Li, G. C., Iliakis, G., and Wang, Y. (2002). Ku affects the ataxia and Rad 3-related/CHK1-dependent S phase checkpoint response after camptothecin treatment. *Cancer Res* 62, 2483-2487.
- Wang, J. C., and Dick, J. E. (2005). Cancer stem cells: lessons from leukemia. *Trends Cell Biol* 15, 494-501.
- Wang, Q., Fan, S., Eastman, A., Worland, P. J., Sausville, E. A., and O'Connor, P. M. (1996). UCN-01: a potent abrogator of G2 checkpoint function in cancer cells with disrupted p53. *J Natl Cancer Inst* 88, 956-965.
- Wang, Z., Wang, S., Fisher, P. B., Dent, P., and Grant, S. (2000). Evidence of a functional role for the cyclin-dependent kinase inhibitor p21CIP1 in leukemic cell (U937) differentiation induced by low concentrations of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine. *Differentiation* 66, 1-13.
- Ward, I. M., and Chen, J. (2001). Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J Biol Chem* 276, 47759-47762.
- Wasylyk, C., Maira, S. M., Sobieszczuk, P., and Wasylyk, B. (1994). Reversion of Ras transformed cells by Ets transdominant mutants. *Oncogene* 9, 3665-3673.

- Wiederschain, D., Kawai, H., Shilatifard, A., and Yuan, Z. M. (2005). Multiple mixed lineage leukemia (MLL) fusion proteins suppress p53-mediated response to DNA damage. *J Biol Chem* 280, 24315-24321.
- Woods, D., Parry, D., Cherwinski, H., Bosch, E., Lees, E., and McMahon, M. (1997). Raf-induced proliferation or cell cycle arrest is determined by the level of Raf activity with arrest mediated by p21Cip1. *Mol Cell Biol* 17, 5598-5611.
- Xue, L., Murray, J. H., and Tolkovsky, A. M. (2000). The Ras/phosphatidylinositol 3-kinase and Ras/ERK pathways function as independent survival modules each of which inhibits a distinct apoptotic signaling pathway in sympathetic neurons. *J Biol Chem* 275, 8817-8824.
- Yang, S., Kuo, C., Bisi, J. E., and Kim, M. K. (2002). PML-dependent apoptosis after DNA damage is regulated by the checkpoint kinase hCds1/Chk2. *Nat Cell Biol* 4, 865-870.
- Yu, J., Zhang, L., Hwang, P. M., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (2001). PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell* 7, 673-682.
- Zachos, G., Rainey, M. D., and Gillespie, D. A. (2003). Chk1-deficient tumour cells are viable but exhibit multiple checkpoint and survival defects. *Embo J* 22, 713-723.
- Zeisig, B. B., Milne, T., Garcia-Cuellar, M. P., Schreiner, S., Martin, M. E., Fuchs, U., Borkhardt, A., Chanda, S. K., Walker, J., Soden, R., et al. (2004). Hoxa9 and Meis1 are key targets for MLL-ENL-mediated cellular immortalization. *Mol Cell Biol* 24, 617-628.
- Zeisig, D. T., Bittner, C. B., Zeisig, B. B., Garcia-Cuellar, M. P., Hess, J. L., and Slany, R. K. (2005). The eleven-nineteen-leukemia protein ENL connects nuclear MLL fusion partners with chromatin. *Oncogene* 24, 5525-5532.
- Zhang, C., Kavurma, M. M., Lai, A., and Khachigian, L. M. (2003). Ets-1 protects vascular smooth muscle cells from undergoing apoptosis by activating p21WAF1/Cip1: ETS-1 regulates basal and and inducible p21WAF1/Cip1: ETS-1 regulates basal and inducible p21WAF1/Cip1 transcription via distinct cis-acting elements in the p21WAF/Cip1 promoter. *J Biol Chem* 278, 27903-27909.
- Zhang, Y. W., Otterness, D. M., Chiang, G. G., Xie, W., Liu, Y. C., Mercurio, F., and Abraham, R. T. (2005). Genotoxic stress targets human Chk1 for degradation by the ubiquitin-proteasome pathway. *Mol Cell* 19, 607-618.
- Zhou, B. B., and Bartek, J. (2004). Targeting the checkpoint kinases: chemosensitization versus chemoprotection. *Nat Rev Cancer* 4, 216-225.
- Zhou, B. B., and Elledge, S. J. (2000). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408, 433-439.
- Zou, L., and Elledge, S. J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* 300, 1542-1548.

8 Abkürzungen

AraC	Cytarabin
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ad	auffüllen auf
AK	Antikörper
AML	Akute myeloische Leukämie
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR	ATM- and Rad3-Related
bp	Basenpaare
<i>CALGB</i>	<i>Cancer and Leukemia Group B</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
Cdk	Cyklin abhängige Kinase
cDNA	<i>copy</i> DNA
CLP	<i>Common lymphoid progenitor</i>
CMP	<i>Common myeloid progenitor</i>
d	Tage (day)
d.h.	dass heißt
Dauno	Daunorubicin
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbeccos's Modified Eagel Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DSB	DNA Doppelstrang Bruch
Erk	<i>Extracellular regulated kinase</i>
et al.	und andere (<i>et altera</i>)
Eto	Etoposid
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i> , Durchflusszytometrie
g	Gravitationskonstante
GAP	<i>GTPase activating protein</i>

Abkürzungen

GDP	Guanin-Nukleotid-Diphosphat
GDS	<i>Guanine nucleotide dissociation stimulator</i>
GEF	<i>Guanine-nucleotide exchange factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GMP	<i>Granulocyte/macrophage progenitor</i>
Gr-1	<i>Granulocyte-differentiation antigen 1</i>
GTP	Guanin-Nukleotid-Triphosphat
h	Stunden
HDAC	<i>High dose AraC</i>
HR	<i>Hazard ratio</i>
HSC	Hematopoietische Stammzellen
IF	Immunfluoreszenz
IGR	Isogranulatimide
IL	Interleukin
kD	kilo Dalton
Ktr	Kontrolle
LDAC	<i>Low dose AraC</i>
LTR	<i>Long terminal repeat</i>
Mac-1	<i>Macrophage-1 antigen</i>
MAP	<i>Mitogen activated kinase</i>
MC	Methylcellulose
Mef	Maus Embryo Fibroblasten
MEK	<i>Mitogen-activated kinase / Erk kinase</i>
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
mGM-CSF	Maus Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
mIL-3	Maus Interleukin-3
mIL-6	Maus Interleukin-6
min	Minuten
Mio	Millionen
ml	Milliliter

Abkürzungen

MLL-ENL	<i>Mixed Lineage Leukemia - Eleven ninteen</i>
MoMuLV	<i>Moloney murine leukemia virus</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mSCF	Maus Stammzell-Faktor (CD117)
MSCV	<i>Murine stem cell virus</i>
mut	mutiert
nM	nano Molar
nm	Nanometer
OHT	4-Hydroxytamoxifen
OIS	Onkogen induzierte Seneszenz
p	phospho
PBS	Phospat Buffered Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
Pfa	Paraformaldehyd
pFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumjodid
PI3K	Phospho-Inositol 3 Kinase
qRT-PCR	quantitative reverse Echtzeit PCR
RAL	Ras related protein
Ras	Rat sarcoma
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT	Raumtemperatur
SA- β -Gal	Seneszenz-assoziierte- β -Galaktosidase
SCF	<i>Stem cell factor</i>
sek	Sekunden
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
w/v	Gewichts/-Volumenverhältnis
WB	Western-blot
wt	wildtyp
μ l	Mikro Liter

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren:

Prof. Dr. Rainer Renkawitz und Dr. Aria Baniahmad an der Justus-Liebig Universität in Gießen.

Prof. Dr. Andreas Neubauer und Prof. Dr. Martin Eilers an der Philipps-Universität Marburg.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich meine dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel:

Ras-induzierte Differenzierung nach Schädigung der DNA in Zellen der akuten myeloischen Leukämie

am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT) der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Andreas Neubauer und Prof. Dr. Martin Eilers ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Mona Meyer

Originalarbeit

Die Arbeit ist Bestandteil eines Manuskripts, das bei PLOS one mit dem Titel *Oncogenic RAS enables DNA damage- and p53-dependent differentiation of acute myeloid leukemia cells in response to chemotherapy* eingereicht wurde.

Kongressbeitrag

Onkologie, International Journal for Cancer Research and Treatment, Supp 3, Band 30, Basel 05.-09. Oktober 2007: Expression of SKI inhibits retinoic acid induced differentiation in AML cells.

Teichler S., Meyer M., Hagner N., Ritter M., Eilers M., Neubauer A.

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Andreas Neubauer und Martin Eilers bedanken. Sie haben mich nicht nur während der Jahre meiner Doktorarbeit betreut, mir immer wieder Rat, Hilfestellungen und ihre Zeit zur Verfügung gestellt, sondern mir auch die Möglichkeit gegeben, an einem sehr interessanten Projekt zu arbeiten und den Austausch zwischen klinischer Forschung und Grundlagenforschung mitzugestalten. Vor allem möchte ich mich aber auch dafür bedanken, dass mir beide Professoren Zeit gegeben haben zu rehabilitieren und meine Arbeit fortzusetzen. Außerdem möchte ich mich bei Robert Slany bedanken, der mir sein Zellsystem und seine Erfahrung bereitgestellt hat, so dass ich überhaupt in der Lage war die Fragestellung, die mein Projekt stellte, zu untersuchen.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei allen Kollegen/innen, die zur AG Neubauer und AG Eilers gehören. Ohne den Austausch, die Ratschläge und Hilfe meiner lieben Kollegen hätte so manches Experiment wohl nicht den gewünschten Erfolg gebracht. Insbesondere danke ich Tobias Otto und Birgit Samans für die Hilfe bei statistischen Fragestellungen, Judith Müller (*für das Vergnügen mit dir das beste Schokoladeneis der Welt genossen zu haben*), Steffi Herold, Birgit Samans, Sabine Teichler (*entschuldige bitte, dass ich dich am Flughafen habe sitzen lassen!*) und Theresia Rosa Maria Kress für das Korrekturlesen meiner Arbeit (*Martin ist trotzdem über meine Kommasetzung beim Lesen verzweifelt... ☺*). Bei Theresia bedanke ich mich insbesondere, dass sie mich in „ihrer“ Zellkultur aufgenommen hat... *dann klappt's auch mit der Infektion ☺* und der AG Puccetti für alle Magneten und Antikörper, die sie mir zur Verfügung gestellt haben.

Meine Arbeit änderte sich, als eine Praktikantin (und spätere Diplomandin) zu meinem Projekt hinzukam und sich plötzlich die Welt des *brainstorming* für mich öffnete – ok, der Begriff meint eigentlich: „*using the brain to storm a problem*“ – und wir hatten in der Tat nicht nur EIN Problem; ich meine aber vor allem, dass es unheimlich viel Spaß gemacht hat über das Projekt zu reden, und nach Ideen zu suchen, während dabei der Chai Tee Latte genüsslich den Gaumen herunterläuft. Die Zeit mit Daniela Rübsamen war wirklich toll und es hat Spaß gemacht mit ihr zusammen an dem Projekt zu arbeiten. Vielen Dank dafür, Danny!

Meine Arbeit wäre nicht über die ersten sechs Monate hinausgekommen, wenn es nicht ganz tolle Menschen gäbe, die in ihrer Aufgabe Menschen fit zu machen, ihnen zu helfen und zu motivieren super kompetent sind. Ein besonderer Dank geht daher an: Maria Pfeiffer, Oliver Thesic, Beate Fexer und Judith Roth. Apropos Motivation, ich bin mir nicht sicher, ob meine Wiedereingliederung so gut funktioniert hätte, wenn ich sie nicht in der AG Krause hätte starten dürfen: Danke Geli, Siggi, Axel und Michael!

Während einer Doktorarbeit geht man durch Höhen und Tiefen, wobei die Tiefen für mein Empfinden überwogen haben. Da gab es Momente, wo alles toll lief und kurz darauf (oft nur Stunden später) Momente, die alles kaputt gemacht haben. (*Eine Freundin hat es mal so ausgedrückt: „Du rennst immer hinter einer Karotte her – monatelang und du kommst ihr immer ein Stück näher, aber wenn du denkst du hast sie schon, wird sie dir vor der Nase weggezogen. Und dann geht das Spiel von vorne los – ich kann verstehen, dass du frustriert bist“ ☺*) Dass diese Tiefen nicht zu „tief“ wurden verdanke ich Menschen wie dieser Freundin und meiner Familie, die mir zugehört haben, mich zum Lachen gebracht haben und Verständnis für meine Gemütslage hatten. Für meine Familie und Freunde ist es, glaube ich, ebenso eine Erleichterung, dass ich diese Arbeit endlich abschließe (...*„wann gibst du denn nun endlich ab?“... Jörg, Britta: „JETZT!“*) wie für mich selbst. Sie haben in vielen Situationen mit mir gefiebert, mir die Daumen gedrückt (*Manfred, danke für die lange Zeit!*) und gehofft, dass am Ende alles gut wird ☺ VIELEN DANK! (*Ihr seht, es ist alles gut geworden*).